

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAIRINE GRAZIELLA ERCOLE

INVESTIGAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS VISANDO PRODUÇÃO DE  
INOCULANTES PARA A CULTURA DO MILHO (*Zea mays* L.)

CURITIBA

2020

TAIRINE GRAZIELLA ERCOLE

INVESTIGAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS VISANDO PRODUÇÃO DE  
INOCULANTES PARA A CULTURA DO MILHO (*Zea mays* L.)

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Genética, no  
programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lygia Vitória Galli Terasawa.

Coorientadores: Profa. Dra. Daiani Cristina Savi.  
Prof. Dr. Douglas Adamoski.

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ercole, Tairine Graziella  
Investigação de isolados bacterianos visando produção de inoculantes  
para a cultura do milho (*Zea mays* L.). / Tairine Graziella Ercole. –  
Curitiba, 2020.

99 p.: il.

Orientadora: Lygia Vitória Galli Terasawa  
Coorientadores: Daiani Cristina Savi e Douglas Adamoski

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Bactérias 2. Endófitos 3. Milho I. Título II. Galli-Terasawa, Lygia  
Vitória III. Savi, Daiani Cristina, 1987- IV. Adamoski, Douglas V.  
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 579.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -  
40001016006P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TAIRINE GRAZIELLA ERCOLE** intitulada: **Investigação de isolados bacterianos visando produção de inoculantes para a cultura do milho (*Zea mays* L.)**, sob orientação da Profa. Dra. LYGIA VITORIA GALLI TERASAWA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

13/04/2020 15:11:08.0

LYGIA VITORIA GALLI TERASAWA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 20:25:02.0

VANESSA MERLO KAVA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/03/2020 10:53:29.0

LISANDRA SANTOS FERREIRA MABA

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL)

## AGRADECIMENTOS

À coordenação do programa de pós-graduação em genética da Universidade Federal do Paraná, à chefia do departamento e aos seus professores, pela oportunidade e por participarem da minha formação.

Agradeço a minha família, pai Altivir, mãe Neide e irmãzinha Tamires, pelo amor e apoio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lygia Vitória Galli Terasawa, pela confiança, dedicação e todos os ensinamentos.

Aos coorientadores Dra. Daiani Cristina Savi e Prof. Dr. Douglas Adamoski, pela paciência, ensinamentos e orientações.

À profa. Dra. Vanessa Merlo Kava pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto, paciência e ensinamento.

Aos colegas e técnico do LabGeM pela colaboração e auxílio.

Ao departamento de fitopatologia da UFPR, profa. Dra. Louise Larissa May de Mio e prof. Henrique da Silva Silveira Duarte, por ter cedido um espaço na câmara climática de plantas, para o crescimento dos milhos.

À Vértika Agropecuária Ltda, Total Biotecnologia Ltda e em especial a Dra. Mariangela Hungria da Embrapa Soja, por nos ajudarem com reagentes para o desenvolvimento desse trabalho.

*“Há quem diga que todas as noites são de sonhos.  
Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão.  
No fundo, isto não tem muita importância.  
O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos.  
Sonhos que o homem sonha sempre,  
em todos os lugares,  
em todas as épocas do ano,  
dormindo ou acordado.”*

William Shakespeare

## RESUMO

A exploração da relação entre microrganismos e plantas pode ser útil para culturas de importância econômica, como o milho (*Zea mays* L.), utilizado principalmente na alimentação humana e animal. Muitos fatores limitantes à produção da cultura podem ser minimizados pelo uso de inoculantes desenvolvidos à base de bactérias com habilidades específicas às suas necessidades. A ação desses microrganismos permite a redução do uso de fertilizantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de uma coleção de bactérias, isoladas à campo da comunidade endofítica radicular do milho, para seu uso como inoculantes formulados para a mesma cultura. Para a triagem das bactérias, os isolados foram agrupados utilizando a técnica de BOX-PCR. A partir, de uma coleção inicial de 413 bactérias, 57 perfis genéticos bacterianos foram identificados. De cada grupo obtido, um isolado foi escolhido aleatoriamente como representante de cada perfil. Através de análises filogenéticas utilizando sequências do gene 16S rRNA, os isolados foram identificados como pertencendo aos gêneros *Bacillus* (60% dos isolados), *Lysinibacillus* (30,52%), *Pseudomonas* (3,15%), *Stenotrophomonas* (2,91%), *Enterobacter* (1,70%), *Paenibacillus* (1,22%), *Rhizobium* (0,25%) e *Atlantibacter* (0,25%). As bactérias representantes foram inoculadas em sementes de milho em ensaio em câmara de cultivo controlado, para verificar o potencial de promoção de crescimento. Foram identificados onze isolados com resultados superiores para estímulos de crescimento radicular, cinco *Bacillus* sp., três *Lysinibacillus* sp., um *Pseudomonas* sp., um *Paenibacillus* sp. e um *Stenotrophomonas* sp. Também foram selecionados isolados para análises moleculares e bioquímicas relacionadas ao possível mecanismo de ação pelo qual atuou na promoção de crescimento. A análise bioquímica dos isolados, foi realizada pela avaliação quando à fixação biológica de nitrogênio (9,1%), solubilização de fosfato (36,3%), produção de sideróforos (54,5%), amilase (90,1%), celulase (72,7%), pectinase (81,8%), protease (90,9%), quitinase (18,2%), urease (54,5%), esterase (45,4%) e a quantificação da produção de AIA. Através de PCR foi avaliada a presença de genes *nifH*, *phlD*, *pqqC*, *ipdC*, *nirK* e *acdS*, encontrando somente os genes *ipdC* (90,9% dos isolados), *pqqC* (54,5%), *nifH* (36,4%) e *nirK* (27,3%). Dentre os isolados que obtiveram destaque em experimento *in vivo*, os isolados que apresentaram maior potencial bioquímico para promover crescimento vegetal em plantas de milho foram: LGMB12, LGMB273, LGMB319, LGMB426, LGMB444 (*Bacillus* sp.) e LGMB429 (*Paenibacillus* sp.).

Palavras-chave: PGPB (Bactérias Promotoras de Crescimento). Bactérias Endofíticas. Inoculantes. *Zea mays* L. BOX-PCR.

## ABSTRACT

The exploration of the relationship between microorganisms and plants can be useful for crops of economic importance, such as maize (*Zea mays* L.), used mainly in human and animal nutrition. Many limiting factors the production of the culture can be minimized using inoculants made from bacteria with specific abilities to their needs. The action of these microorganisms allows to reduce the use of fertilizers. This study aimed to evaluate the biotechnological potential of bacterial, isolated in the field of the root endophytic community of maize, for use as formulated inoculants for the same culture. For the screening of bacteria, the isolates are grouped using the BOX-PCR technique. From an initial collection of 413 bacteria, 57 bacterial genetic profiles were identified. From each group obtained, one isolate was randomly chosen as the representative of each profile. Through phylogenetic analyzes using 16S rRNA gene sequence, the isolated were identified as belonging to the genera *Bacillus* (60% of the isolates), *Lysinibacillus* (30,52%), *Pseudomonas* (3,15%), *Stenotrophomonas* (2,91%), *Enterobacter* (1,70%), *Paenibacillus* (1,22%), *Rhizobium* (0,25%) and *Atlantibacter* (0,25%). The representative bacteria were inoculated in maize seeds in a controlled culture chamber test, to verify the growth-promotion potential. Eleven isolates with superior results for root growth stimuli were identified, five *Bacillus* sp., three *Lysinibacillus* sp., one *Pseudomonas* sp., one *Paenibacillus* sp. and one *Stenotrophomonas* sp. Isolates were also selected for molecular and biochemical analyzes related to the possible mechanism of action by which it acted growth-promoting. The biochemical analyzes of the isolates was carried out by the evaluation when biological fixation of nitrogen (9,1%), phosphate solubilization (36,6%), production of siderophores (54,5%), amylase (90,1%), cellulase (72,7%), pectinase (81,8%), protease (90,9%), chitinase (18,2%), urease (54,5%), esterase (45,4%) and the quantification of IAA production. The presence of *nifH*, *phlD*, *pqqC*, *ipdC*, *nirK* and *acdS* genes was evaluated through PCR, finding only *ipdC* (90,9% of the isolates), *pqqC* (54,5%), *nifH* (36,4%) and *nirK* (27,3%) genes. Among the isolates that achieved prominence in an *in vivo* experiment, the isolates that showed biochemical potential to promote plant growth in maize plants were LGMB12, LGMB273, LGMB319, LGMB426, LGMB444 (*Bacillus* sp.) and LGMB429 (*Paenibacillus* sp.).

Keywords: PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria). Endophytic Bacteria. Inoculants. *Zea mays* L. BOX-PCR.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mecanismos diretos e indiretos dos exsudados pelas PGPB que afetam o crescimento das plantas .....25
- Figure 1 – Dendrogram obtained with BOX-PCR amplification products from maize isolates. Forming 56 different gene profiles. Cluster Analysis using the UPGMA algorithm and Jaccard's coefficient. The number in parenthesis represents the number of isolates with the same genetic profile as the selected LGMB. The number at nodes represent bootstrap support of the clustering when it is above 50%. Genus obtained by partial sequence of the 16S rRNA gene, using Bayesian analysis .....39
- Figure 2 – Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB315 and 2 type strains of *Atlantibacter* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Salmonella typhimurium* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....42
- Figure 3 – Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB and 275 type strains of *Bacillus* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Caldibacillus debilis* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....44
- Figure 4 – Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB206 and 15 type strains of *Enterobacter* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Serratia marcescens* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....45
- Figure 5 – Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB10, LGMB20, LGMB23, LGMB45, LGMB65, LGMB78, LGMB99, LGMB95, LGMB106, LGMB324, LGMB445, LGMB446 and 26 type strains of *Lysinibacillus* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Paenibacillus polymyxa* was used as

	outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....	46
Figure 6 –	Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB429 and 246 type strains of <i>Paenibacillus</i> genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species <i>Bacillus subtilis</i> was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....	47
Figure 7 –	Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB105, LGMB346, LGMB456, LGMB459 and 198 type strains of <i>Pseudomonas</i> genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species <i>Acinetobacter baumannii</i> was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....	48
Figure 8 –	Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB69 and 96 type strains of <i>Rhizobium</i> genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species <i>Bradyrhizobium japonicum</i> was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....	49
Figure 9 –	Bayesian phylogenic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB417, LGMB432 and 17 type strains of <i>Stenotrophomonas</i> genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species <i>Pseudomonas aeruginos</i> was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database .....	50
Figure 10 –	Dry weight of maize plants (in grams) of the 57 bacterial isolates (LGMB). Evaluating growth promotion parameters, after 30 days of inoculation in maize seeds, in a climatic chamber of plants. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD .....	52
Figure 11 –	Total root length of maize (in centimeters) of the 57 bacterial isolates (LGMB). Evaluating growth promotion parameters, after 30 days of inoculation in maize seeds, in a climatic chamber of plants. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD .....	53

- Figure 12 – Total length of roots of maize from 0 to 0,5 mm in diameter (in centimeters) of the 57 bacterial isolates (LGMB). Evaluating growth promotion parameters, after 30 days of inoculation in maize seeds, in a climatic chamber of plants. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD .....54
- Figure 13 – Activity to promote root growth in maize plants with 11 bacterial isolates and positive control (*Azospirillum brasilense*). Quantification of indole acetic acid. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD .....57

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Genes selecionados presentes em microrganismos relacionados promoção de crescimento vegetal .....	29
---	----

## LISTA DE TABELAS

Table 1 –	Primers used to amplify genes related to plant growth-promoting.....	37
Table 2 –	LGMB isolates and their respective genus obtained through phylogenetic analysis, from the sequencing of the 16S rRNA gene .....	40
Table 3 –	Presence or absence of the gene and biochemical tests (Bioch.) in the isolates with the best performance in plant climatic chambers .....	56
Table 4 –	Presence or absence of biochemical tests for enzyme production in isolates with the best performance in plant climatic chambers.....	58

## LISTA DE SIGLAS

2,4- DAPG – 2,4-diacetylphloroglucinol  
ACC – Ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico  
AG - Agrocere  
AIA – Ácido Indol Acético  
ATP – Adenosina Trifosfato  
CAS – Cromoazurol S  
CV – Coeficiente de Variação  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio  
Fe – Ferro  
HTDMA - Hexadecyltrimethylamonium  
ISR – *Induced Systemic Resistance* – Resistência Sistêmica Induzida  
J – Coeficiente de Jaccard  
LabGeM – Laboratório de Genética de Microrganismos  
LB – Luria Bertani  
LEMID – Laboratório de Epidemiologia Para Manejo Integrado de Doenças de Plantas  
MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária  
MAPG – Monoacetilfloroglucino I  
N – Nitrogênio  
N ha<sup>-1</sup> – Nitrogênio por hectare  
P – Fósforo  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PGPB – *Plant Growth Promotion Bacteria* (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas)  
rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico  
UFPR – Universidade Federal do Paraná  
UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method* – Método de Ligação Média Entre Grupos  
VOC – *Volatile organic compound* – Compostos Orgânicos Voláteis

## LISTA DE ABREVIATURAS

cm – Centímetro  
cm<sup>3</sup> – Centímetro Cúbico  
g – Grama  
g/L – Grama Por Litro  
h - Hora  
ha – Hectare  
Kb - Quilobase  
Kg – Quilograma  
μM – Micromolar  
μL – Microlitro  
μg mL<sup>-1</sup> – Micrograma Por Mililitro  
M - Molar  
mg – Miligrama  
mg/L – Miligrama Por Litro  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
mM – Milimolar  
min - Minuto  
N ha<sup>-1</sup> – Nitrogênio por hectare  
ng – Nanograma  
nm – Nanômetro  
pb – Pares de Bases  
q.s.p. – Quantidade Suficiente Para  
rpm – Rotação Por Minuto  
seg – Segundo  
sp ou spp – Espécie  
U/μL – Micromolar por Minuto por Microlitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

® – Marca Registrada

% – Porcentagem



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
3.1 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS .....	21
3.2 BIOFERTILIZANTE INDUSTRIAL .....	23
3.3 MECANISMOS DIRETOS E INDIRETOS DAS BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO .....	24
3.4 ANÁLISE MOLECULAR DA DIVERSIDADE BACTERIANA.....	27
3.5 GENES ASSOCIADOS À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	29
ARTIGO: Identification and characterization of growth-promoting bacteria from maize ( <i>Zea mays</i> L.) roots with biotechnological potential in agriculture .....	32
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE 1 – MATERIAL E MÉTODOS DETALHADOS .....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE 2 – TABELAS COM RESULTADOS DETALHADOS .....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias endofíticas colonizam o interior das plantas sem causar prejuízo ao hospedeiro (MARIANO et al., 2013). Diferente de bactérias rizotróficas, as endofíticas não estão sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorre no solo da rizosfera e possuem maior eficiência na promoção de crescimento (HASSANI; DURÁN; HACQUERD, 2018). Isto acontece porque elas já estão presentes no interior do sistema radicular, onde os compostos bioativos sintetizados por elas encontram-se prontamente disponíveis às plantas (SANTOS et al., 2005). Algumas endofíticas tem capacidade para a promoção de crescimento e são denominadas bactérias promotoras de crescimento de plantas, com a sigla: PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) (MARIANO et al., 2013).

Um exemplo de promotores de crescimento mais bem estudado é o gênero *Azospirillum*, relacionado com a produção de fitormônios que induzem o crescimento radicular e melhoram a absorção de água e nutrientes pelas plantas (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012). A produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas tem sido observada também em bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (HUNGRIA et al., 2010; VIDEIRA et al., 2012). Algumas podem ser utilizadas para tratamento de sementes, transplantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos e em pós-colheita (MARIANO et al., 2013).

Alguns dos benefícios obtidos pela relação hospedeiro vegetal-microrganismo são controle de pragas, controle de fitopatógenos, produção de metabólitos de interesse farmacológico, promoção de crescimento, aumenta a absorção de nutrientes no solo, vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras, fixação biológica de nitrogênio e potencializam a obtenção de produtos biológicos que podem evitar ou reduzir o uso de agroquímicos (GALVÃO et al., 2010; OWEN et al., 2015; HERRERA et al., 2016; BULEGON et al., 2017).

Atualmente existem diversos produtos biológicos à base de PGPB sendo comercializados no mundo, sendo que para a cultura do milho, o inoculante mais difundido é a base de *Azospirillum brasilense*, contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, e recentemente, um produto com bactérias co-inoculadas, com *Bacillus subtilis* e

*Bacillus megaterium* (ANTUNES, 2019). O inoculante é caracterizado como um produto biotecnológico capaz de atuar favoravelmente no desenvolvimento das plantas e composto por bactérias específicas para cada espécie vegetal (EMBRAPA, 2018). E são baseados na interação entre a bactéria-planta, agindo de forma direta ou indireta para o crescimento vegetal (BOURSCHEIDT et al., 2019).

Sendo o milho (*Zea mays* L.) uma cultura expressiva a nível mundial e nacional, pode ser beneficiada pela presença de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) e controle biológico de doenças (MARIANO et al., 2013). De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2020), a produção mundial de milho passará de 1 bilhão de toneladas nessa safra, sendo a maior produção dos Estados Unidos, seguida da China e em terceiro lugar o Brasil, com uma produção de quase 99 milhões de toneladas esperados para a safra de 2019/2020. O Paraná ocupa lugar de destaque na produção nacional do grão, com a produção de aproximadamente 16 milhões de toneladas, somando a produção da primeira e da segunda safra, ficando atrás apenas do Mato Grosso (CONAB, 2020).

Um dos principais fatores limitantes à produção de milho é a deficiência de nitrogênio (N) que afeta a produção de biomassa em ecossistemas agrícolas (CERIGIOLI, 2005; CONCEIÇÃO et al., 2009). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Milho e Sorgo (2015), a recomendação da adubação nitrogenada em cobertura para a cultura do milho varia de 40 a 80 Kg de N ha<sup>-1</sup>. Sendo muito utilizada para essa finalidade a ureia (45% de N), que é um fertilizante nitrogenado sintético, esses adubos geralmente apresentam baixo aproveitamento pelas plantas, em torno de 42 a 49% (EMBRAPA, 2015). Fato esse que ocorre decorrente das perdas de N pelo ambiente, que são causadas devido a imobilização do nutriente por bactérias, assim como a possibilidade de lixiviação ou volatilização desse (MOREIRA; VALADÃO; VALADÃO JÚNIOR, 2019). Sob a ótica econômica e ambiental, a decisão sobre a necessidade de adubação nitrogenada deve levar em consideração alguns fatores para uma recomendação segura, tais como: condições edafoclimáticas, sistema de cultivo, época de semeadura, responsividade do material genético, rotação de culturas, época e modo de aplicação, fontes de N e aspectos operacionais (BOBATO, 2006; MOREIRA; VALADÃO; VALADÃO JÚNIOR, 2019).

Portanto, a utilização de inoculantes atua de maneira a aumentar a produtividade de determinada cultura, por meio do auxílio na disponibilidade de nutrientes e crescimento radicular da planta, o que não apenas reverte a um menor custo de produção como também leva à preservação ambiental (EMBRAPA, 2018).

Considerando as vantagens que podem ser obtidas do uso de rizobactérias na agricultura, esse trabalho objetivou avaliar o potencial biotecnológico de uma coleção de bactérias isoladas a campo da comunidade endofítica radicular de milho, para confecção de inoculantes formulados para a cultura do milho (*Zea mays* L.).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de bactérias endofíticas para utilização como inoculantes formulados na cultura do milho (*Zea mays* L.), a partir de uma coleção estabelecida de rizobactérias desta cultura.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a diversidade das bactérias pertencentes à coleção biológica do LabGeM, por meio da técnica de BOX-PCR;
- Identificar taxonomicamente ao nível de gênero os isolados selecionados por análise filogenética utilizando o sequenciamento parcial do DNA codificante do gene 16S rRNA.
- Avaliar o efeito de bactérias endofíticas de milho para utilização como promotores de crescimento, selecionando os isolados com melhor desempenho radicular, em experimento em câmara climática para plantas;
- Identificar o potencial biotecnológico dos isolados, por meio de PCR, de genes relacionados a rotas metabólicas de promoção de crescimento;
- Verificar o potencial para promoção de crescimento vegetal dos isolados, por meio de metodologias *in vitro*;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Microrganismos endofíticos foram descobertos no início do século 19, mas foi Bary (1866 apud AZEVEDO, 1998), quem primeiro distinguiu esses de patógenos de plantas, caracterizando-os como assintomáticos, ou seja, que não causam efeitos benéficos ou maléficos às plantas. Porém, na década de 70, descobriu-se que esses organismos não eram simples habitantes dos vegetais, pois proporcionavam propriedades de interesse às plantas, como proteção contra insetos e a outros organismos patogênicos (AZEVEDO, 1998). Trabalhos mais recentes apontam que estes microrganismos podem produzir metabólitos secundários com potencial de aplicação farmacêutica (como antibióticos), fatores de crescimento vegetal e outros produtos de interesse biotecnológico (OLIVEIRA et al., 2019).

A produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas tem sido observada também em bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (HUNGRIA et al., 2010; VIDEIRA et al., 2012). Desde o isolamento de *Beijerinckia fluminense* da rizosfera de cana-de-açúcar (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958) e com a reclassificação dessa para *Azospirillum lipoferum* isolado de raízes de diversas gramíneas (DÖBEREINER; DAY, 1976), novas espécies de bactérias diazotróficas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas, cafeeiros, bananeiras, abacaxizeiros, batata-doce e mandioca (WEBER; BALDANI; DÖBEREINER, 2000). Um dos exemplos de promotores de crescimento mais bem estudados é o gênero *Azospirillum*, relacionado com a produção de fitormônios que induzem o crescimento radicular e melhoram a absorção de água e nutrientes pelas plantas (DOORNBOS; VAN LOON; BAKKER, 2012).

O trabalho de Raju, Evans, Seidler (1972) já trazia considerações preliminares sobre pesquisas focadas na fixação biológica de nitrogênio considerando plantas não leguminosas. Os autores discutem aspectos da atividade microbiológica na rizosfera de várias espécies de plantas, buscando evidências da atividade de fixação de nitrogênio, ainda desconhecida na época. Também, existem bactérias conhecidas como colonizadoras exclusivas de gramíneas, que podem ser encontradas em diversas culturas, como, por exemplo, *Herbaspirillum seropedicae*

colonizando raízes de milho (SCHMIDT et al., 2011). Bactérias fixadoras de nitrogênio quando associadas à rizosfera das plantas podem contribuir com a sua nutrição nitrogenada (ROCHA et al., 2019), estudos de associação assimbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio com raízes de milho, tem apresentado resultados promissores (PICAZEVICZ; KUSDRA; MORENO, 2019).

Além da espécie, as bactérias ainda podem ser identificadas por estirpes. E estas podem se diferenciar entre si pela maior ou menor capacidade de promover crescimento de plantas (ARAÚJO, 2018). Observa-se ainda que existe uma certa afinidade entre as estirpes bacterianas e as cultivares, quanto a atividade das enzimas, nutrientes acumulados, ciclo natural e hábito de crescimento, o que conferem diferenças na promoção de crescimento (FONSECA et al., 2013). Essa ação ocorre dependendo da interação de genótipos da planta e da bactéria (COELHO et al., 2007; SABINO, 2007; IKEDA et al., 2013), uma vez que a qualidade dos exsudados radiculares pode determinar a preferência das bactérias por determinadas espécies e cultivares (NEHL; ALLEM; BROWN, 1997). Sendo assim necessário selecionar a melhor estirpe para determinada cultura (BOUTON; ALBRECHT; ZUBERER, 1985; CABALLERO-MELLADO; CARCANI-MONTIEL; MASCARUA-ESPARZA, 1992; PENOT et al., 1992; GARCIA DE SALOMONE et al., 1996). O uso de inoculantes mais adequados para a cultura já comprovaram aumentos significativos na produção (WANI; CHANDRAPALAIH; SART, 1985; KAPULNIK; OKON; HENIS, 1987).

As gramíneas podem desenvolver relações de simbiose com organismos fixadores de nitrogênio, mas nessas associações os nódulos não são produzidos, a bactéria coloniza os tecidos do vegetal ou se ancora na superfície da raiz, principalmente próximas da zona de alongamento e dos pelos radiculares (REIS et al., 2000). Estudos relatam a ação de promoção de crescimento por rizobactérias (PENG et al., 2009; SANSINENA, 2019), ação de biocontrole de doenças e proteção contra estresse (BERG et al., 2010; FERJANI et al., 2019) em diversas plantas.

No milho, existem diversos estudos de associações com bactérias fixadoras de nitrogênio (HERRERA et al., 2016; BULEGON et al., 2017; MOREIRA; VALADÃO; VALADÃO JÚNIOR, 2019). Estas bactérias auxiliam na assimilação do nitrogênio atmosférico por processos de colonização da superfície e/ou interior das raízes (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2010). Isso ressalta a

importância da seleção de estirpes adaptadas às condições de cultivo (BODDEY; DÖBEREINER, 1995; BALDANI et al., 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; ROESH et al., 2005; HERRERA et al., 2016; BULEGON et al., 2017; MOREIRA; VALADÃO; VALADÃO JÚNIOR, 2019).

Além da fixação biológica de nitrogênio, alguns desses microrganismos também possuem a capacidade de solubilizar fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, produzir ou alterar a concentração de hormônios na planta, tais como ácido indol acético (AIA), ácido giberélico, citocininas e etileno, o que pode promover e/ou favorecer o crescimento vegetal (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2010; OLIVEIRA et al., 2018).

Assim, é possível que, além de realizar fixação biológica do nitrogênio (FBN), essas bactérias podem promover o aumento da biomassa das plantas, produzindo substâncias que resultam em crescimento radicular e consequente aumento na absorção de água e nutrientes (VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010).

### 3.2 BIOFERTILIZANTE INDUSTRIAL

Inoculante, por definição legal, de acordo com o artigo 3º, inciso C, da lei 6.894 de 16 de dezembro de 1980 (com redação alterada pela lei 6.934, de 13 de julho de 1981), é a substância que contenha microrganismos com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal (BRASIL, 1980).

A produção de inoculante comercial, começou na década de 50, no Brasil (FREIRE et al., 1968). Resultados obtidos por Oliveira et al. (2006), indicaram que o inoculante bacteriano é uma estratégia viável para melhorar a fixação biológica de nitrogênio e consequentemente aumentar a produtividade da cultura. Sendo assim inoculantes de baixo custo tornaram-se alvo de interesse para aplicação na agricultura (PANDEY; MAHESHWARI, 2007).

Existem duas formas físicas de inoculantes: sólidos e líquidos (ARAÚJO, 2018). Os sólidos são em pó, tendo a turfa como suporte para as bactérias e os líquidos, com a bactéria estabilizada em seus processos metabólicos por protetores celulares, que permitem que a célula bacteriana permaneça viva e ativa por um período maior de tempo (CARVALHO; FERREIRA; HUNGRIA, 2010).

A eficácia e sobrevivência de um inoculante depende principalmente da produção e armazenamento adequados (LOBO et al., 2019), que garantam um



número necessário de células microbianas viáveis (mínimo de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) (HUNGRIA, 2011). Este armazenamento deve levar em consideração o tempo, temperatura e umidade (EMBRAPA, 2018). E a produção em grande escala deve cuidar dos transportadores e protetores celulares, bem como a facilidade de aplicação, manutenção dos efeitos sobre o cultivo e não aplicação conjunta com agroquímicos (LOBO et al., 2019). A resposta da inoculação pode variar de acordo com o genótipo da planta, estirpe bacteriana, condições ambientais, práticas agrícolas, e a quantidade e qualidade das células de PGPB utilizadas (IKEDA et al., 2013; MATSUMURA et al., 2015). Inoculantes produzidos com qualidade garantem eficiência e baixo custo econômico, que promove crescimento e rendimento da cultura (LOBO et al., 2019).

Estirpes que demonstram potencial de promoção de crescimento em estudos a campo são selecionadas, passam a ser recomendadas e são cadastradas pelo MAPA para que possam ser usadas na produção de inoculantes (ARAÚJO, 2018).

No mercado brasileiro, para a cultura do milho, o inoculante mais difundido e utilizado contém a bactéria *Azospirillum brasilense*, contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, um exemplo é o AzoTotal®, da empresa Total Biotecnologia (EMBRAPA, 2011; MILLEO; PEREIRA, 2017). Esse, produz fitormônios que promovem maior desenvolvimento do sistema radicular, confere maior resistência a estresse salino e seca, e facilita a fixação de nitrogênio atmosférico (MILLEO; PEREIRA, 2017). Recentemente foi lançado um novo produto, BiomaPhos®, da empresa Bioma, onde as bactérias promotoras de crescimento, co-inoculadas a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*, são capazes de solubilizar o fósforo no solo, aumentando assim a absorção do nutriente pela cultura do milho (ANTUNES, 2019).

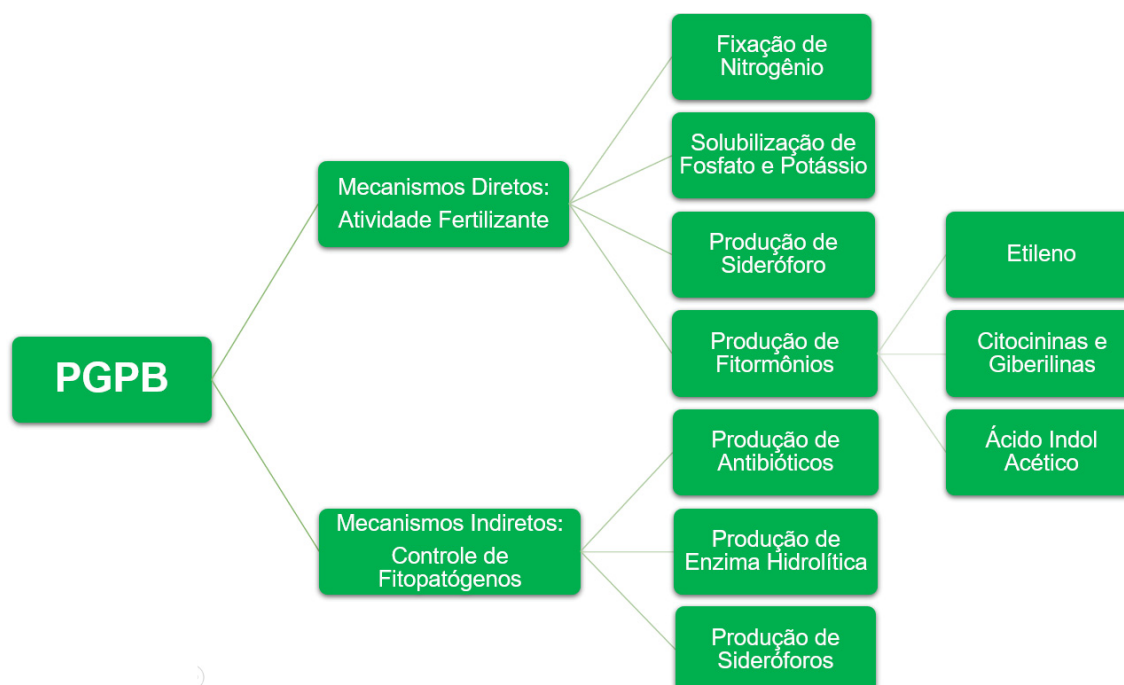
### 3.3 MECANISMOS DIRETOS E INDIRETOS DAS BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

Algumas bactérias podem melhorar a nutrição vegetal fornecendo nutrientes específicos, principalmente ferro e fósforo por meio da produção de sideróforos e solubilização de fosfatos inorgânicos, respectivamente (GALVÃO et al., 2010; CHAIHARN; LUMYONG 2011; SPOLAOR et al., 2016; LOBO et al., 2019). Também, alguns isolados bacterianos são capazes de produzir auxinas como o ácido indol

acético (DEY et al., 2004; KOUR et al., 2019). As bactérias fixadoras de nitrogênio interagem com raízes de plantas e auxiliam na ciclagem de nutrientes, além de contribuírem com nitrogênio em plantações, representando economia nos custos de produção (MOREIRA et al., 2010; KOUR et al., 2019).

A utilização de bactérias que promovem o crescimento vegetal, ocorre por meio de diversos mecanismos (Figura 1), esses mecanismos auxiliam na maior absorção de água e de nutrientes, na fixação de nitrogênio do ar, atuam no controle biológico, entre outros (REIS, 2007).

Figura 1 - Mecanismos diretos e indiretos dos exsudados pelas PGPB que afetam o crescimento das plantas.



Fonte: Adaptado de SANSINENEA (2019).

O nitrogênio é um dos nutrientes importantes para o desenvolvimento vegetal, fazendo parte de diversos mecanismos bioquímicos, como fotossíntese por exemplo, e formando proteínas, ácidos nucleicos, entre outras biomoléculas (SANSINENEA, 2019). Porém, esse nitrogênio não se encontra prontamente disponível para as plantas, sendo necessária a conversão do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ) para absorção, e a fixação biológica envolve essa conversão (SANSINENEA, 2019). Microrganismos que possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, são capazes de tal ação, ou seja, o complexo enzimático nitrogenase se liga ao gás nitrogênio atmosférico e doa elétrons em uma sequência de reações

que gastam energia de moléculas de ATP, essas reações provocam a redução do  $N_2$  produzindo moléculas de amônia, que é a forma assimilável pelas plantas (AMABIS; MARTHO, 2006).

Outros nutrientes como fósforo e potássio são essenciais para o crescimento de plantas, porém encontram-se no solo de forma inacessível aos vegetais, portanto a utilização de PGPB que fazem a solubilização desses é de extrema importância, implicando no aumento da disponibilidade dos mesmos para as plantas hospedeiras (RICHARDSON, 2001; GALVÃO et al., 2010).

O ferro é um elemento insolúvel no solo, estando presente geralmente na forma férrica oxidada ( $Fe^{3+}$ ), no entanto as plantas apresentam melhor absorção da forma ferrosa reduzida ( $Fe^{2+}$ ) (SONG et al., 2019). Segundo Sansinenea (2019) microrganismos capazes de produzir sideróforo de ligação de ferro, aumentam a disponibilidade de ferro solúvel ao redor das raízes das plantas. Esta produção também atua através de mecanismos indiretos, onde substâncias quelam o ferro da rizosfera, inibindo alguns microrganismos que dependem do ferro para a sobrevivência, incluindo fitopatógenos, que têm menor capacidade de competição por ferro, aumentando assim a resistência natural da planta (VIEIRA JÚNIOR et al., 2013).

Um dos mecanismos diretos que promovem crescimento vegetal é a produção de fitormônios, que incluem auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácidos abscísicos. O ácido indol acético é uma auxina, produzida por muitos organismos associados as plantas, o AIA estimula o alongamento e divisão radicular (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; VANÇAN, 2012). A presença de AIA na planta implica na estimulação do crescimento ou antagonismo contra patogenicidade do vegetal, sendo um importante componente para as PGPB (PATTEN; GLICK, 1996; BRUTO et al., 2014). Contudo, existem níveis ótimos de AIA, pois as raízes são extremamente sensíveis à auxina, quando essa presentes em pequenas quantidades ocorre aumento na resposta da planta, porém o aumento na concentração pode ocasionar efeito inibitório (PEREIRA et al., 2018).

As citocininas são uma classe de fitormônios conhecidos por promover divisões celulares, aumento celular e expansão tecidual em certas partes das plantas (RIEFLER et al., 2006). As giberelinas estão associadas a vários processos de desenvolvimento como germinação, alongamento de caules, floração e desenvolvimento de frutos, também promovem crescimento de raízes e o atraso na

senescência celular das plantas (GOMI; MATSUOKA, 2003; HA et al., 2012). O etileno é o único fitormônio gasoso, cuja produção na planta pode ser induzida por perturbação física ou química dos tecidos vegetais e é um importante modulador de crescimento e desenvolvimento normal das plantas (GLICK, 2014).

Já os mecanismos indiretos, como a produção de antibióticos e produção de enzimas hidrolíticas, incluem efeitos inibitórios de vários patógenos nas plantas através de substâncias antagonistas (FIGUEIREDO et al., 2016). Uma importante via de biocontrole é a produção de compostos orgânicos voláteis (*Volatile organic compounds* – VOC), que são compostos à base de carbono (SELIM et al., 2017). Esses compostos são produzidos pelas PGPB e conferem amplo espectro de ação e confere proteção a diferentes tipos de patógenos, porém possuem atuação principal sobre a fungistase, que se trata da redução do crescimento ou germinação de propágulos fúngicos presentes no solo (GARBEVA et al., 2011).

Rizobactérias endofíticas assim como os patógenos microbianos disputam os mesmos nichos de colonização nos vegetais hospedeiros, ambos consumindo os nutrientes essenciais disponíveis, assim ao ocupar esses ambientes, bactérias benéficas restringem o desenvolvimento dos patógenos competidores (HASSANI; DURÁN; HACQUERD, 2018). As PGPB podem atuar induzindo resistência sistêmica (*Induced Systemic Resistance* – ISR) ao vegetal, o que torna as plantas menos susceptíveis a infecções subsequentes (CHOUDHARY; PRAKASH; JOHRI, 2007). A ISR atua promovendo maior produção de metabólitos envolvidos no processo de defesa, causando assim fortificação das paredes celulares e outras alterações fisiológicas responsáveis pela proteção à eventuais exposições a patógenos (DEY; PAL; TILAK, 2014).

### 3.4 ANÁLISE MOLECULAR DA DIVERSIDADE BACTERIANA

A diversidade genética, intra e interpopulacional, podem ser estudadas através de marcadores moleculares (SOUZA et al., 2008), isoenzimas ou de sequências específicas de DNA (FERREIRA; GRATTAPLAGIA, 1998). Ainda existe regiões não expressas no genoma, ou seja, regiões conservadas nas sequências de DNA, essas são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independente da diferenciação ou do estágio de desenvolvimento do organismo, e não sofrem

influência do meio ambiente, de efeitos pleiotrópicos e epistáticos (JOSHI et al., 2004; AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

Sendo assim, técnicas moleculares têm permitido avanço considerável no estudo da diversidade microbiana (O'DONNELL; GÖRES, 1999; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000), e são amplamente utilizadas para análise da estrutura populacional, uma vez que as estirpes apresentam perfis únicos de DNA.

Uma dessas técnicas é a BOX-PCR, que por meio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), é capaz de detectar a diversidade genética dentro de um grupo de bactérias (PEREIRA et al., 2007; IKEDA et al, 2013). A tipagem com BOX-PCR tem como alvo sequências localizadas entre elementos repetitivos intercalados de DNA, resultando em produtos de amplificação de tamanhos diferentes que geram uma *fingerprint* genômica de cepas bacterianas individuais (NAYAK; BADGLEY; HARWOOD, 2011). Essa metodologia mostra-se eficiente, rápida e de baixo custo para caracterização genética de estirpes (FERNANDES; SOUZA; CAMPANHARO, 2009).

A caracterização das sequências do gene ribossomal 16S rRNA tem sido utilizada em estudos evolutivos, taxonômicos e ecológicos, pois apresenta um elevado grau de conservação em todas as espécies (RAMAGNOLI et al., 2020; FERNÁNDEZ; GALDEANO; CONCI, 2020; JAHNES; SABREE, 2020). Embora o sequenciamento do 16S rRNA seja utilizado em estudos de classificação bacteriana, para alguns gêneros apresenta baixo poder discriminatório para caracterizar espécies, isso ocorre devido ao reconhecimento de novas taxa, pouca informação em banco de dados, alta identidade com a sequência de outras espécies ou mesmo sequências variadas identificadas como a mesma espécie ou complexo (JANDA; ABBOTT, 2007). Para a determinação de espécie nesses gêneros, como no caso do gênero *Bacillus*, é necessária uma análise *multilocus*, genes que apresentam sequências conservadas dentro da espécie, podendo assim ocorrer a diferenciação (TORTOLI, 2014). Sendo assim além da utilização do gene estrutural 16S rRNA, outros genes os chamados *housekeeping*, que são genes característicos do gênero em questão, como por exemplo no caso de *Bacillus*, os genes *gyrB* e *pcrA* são utilizados para a determinação da espécie (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014; LIU et al., 2015).

### 3.5 GENES ASSOCIADOS À PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

A fixação biológica representa uma das formas de fixar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ), podendo ser realizada por organismos que possuem o operon *nif*, com o gene *nifH* (Tabela 1) sendo expresso (RIOS, 2019). Ocorre a produção de  $NH_3$  a partir de  $N_2$  e  $H_2$ , liberando quantidades substanciais de  $H^+$  que é reduzida ao gás  $H_2$ , esse processo contém hidrogenase, uma enzima que pode clivar o  $H_2$  formado e gerar elétrons para a redução do  $N_2$  (MARSCHNER, 1995). Este gene também codifica a dinitrogenase redutase, também chamada ferro-proteína, do complexo da nitrogenase (RAYMOND et al., 2004).

Quadro 1. Genes selecionados presentes em microrganismos relacionados à promoção de crescimento vegetal.

Promoção de crescimento	Função	Mecanismo de ação	Nome do gene	Sigla
Disponibilidade de Nitrogênio	Fixação Biológica de Nitrogênio	Direto	Nitrogenase Redutase	<i>nifH</i>
	Redutase do Nitrito de Cobre	Direto	Nitrito Redutase	<i>nirK</i>
Disponibilidade de Fósforo	Solubilização de Fosfato	Direto	Pirroloquinolina Quinina Sintase	<i>pqqC</i>
Produção de AIA	Síntese de Ácido Indol Acético	Direto	Indolepiruvato/ Fenilpiruvato Descarboxilase	<i>ipdC</i>
Controle Biológico	Síntese de Floroglucionol	Indireto	Policetídeo Sintase	<i>phlD</i>
	Degradação do Precursor de Etileno	Indireto	1-Aminociclopropano-1-Carboxilato Desaminase	<i>acdS</i>

Fonte: A autora (2020).

Há outros genes relacionados a funções benéficas das bactérias para as plantas (Tabela 1), como o gene *phlD*, que é responsável pela síntese de floroglucionol, que é uma substância fenólica, atuando sinergisticamente ao ácido indol butílico na promoção de enraizamento (PEIXOTO, 2017). Quando essa via metabólica está presente e sendo expressa nos organismos, essa demonstra uma importante atividade também no biocontrole vegetal, combatendo patógenos fúngicos (ZHANG et al., 2006). Esse gene é transcrito como um operon de um

promotor a montante do gene *phlA*, e é responsável pela produção de monoacetilfloroglucino I (MAPG) que converte em 2,4-DAPG, composto que possui a habilidade de antagonismo a microrganismos patogênicos, além de auxiliarem a competição por espaço e nutriente (ZHANG et al., 2006; BRUTO et al., 2014).

O fósforo (P) é um macro-elemento essencial para as plantas, e sua disponibilidade é frequentemente limitada no solo, sabe-se que diversas bactérias solubilizam o fosfato de complexos do solo, tornando-os disponíveis para as plantas, promovendo assim melhor crescimento vegetal (MEYER et al., 2011). As formas inorgânicas de P são geralmente solubilizadas pelas PGPBs através da produção e excreção de ácidos orgânicos ou por degradação enzimática, que através de grupos hidroxilas e carboxilas, quelam cátions ligados ao fosfato convertendo em formas solúveis (HANIF et al., 2015). O ácido glucônico é o principal ácido orgânico responsável pela solubilização de fosfatos minerais por bactérias endofíticas e sua síntese é catalisada pela holoenzima glicose desidrogenase (*gdh*) que, juntamente com seu cofator pirroloquinolina quinina (*pqqC*) (Tabela 1) catalisa a oxidação extracelular direta de glicose em ácido glucônico (AHMED; SHAHAB, 2011; BATISTA, 2017). Pirroloquinolina quinina tem sido referida como um promotor de crescimento vegetal, contribuindo assim para a solubilização de fosfato mineral (CHOI et al., 2008; MEYER et al., 2011; BRUTO et al., 2014).

O ácido indol acético é sintetizado pela própria planta, porém descobriu-se que alguns microrganismos bacterianos são capazes de sintetizar essa auxina, o gene *ipdC* (Tabela 1) contribui para a síntese do fitormônio ácido indol-3-acético (VANÇAN, 2012). A síntese de AIA em bactérias endofíticas acontece a partir do triptofano, que sofre trasaminação a ácido indol-3-pirúvico, o qual é descarboxilado a indol-3-acetadeído, sequencialmente uma indolacetaldeído oxidase transforma o indol-3-acetaldeído em ácido indol-3-acético (KOGA; ADACHI; HIDAKA, 1991). Ácido indol-3- láctico e triptofol são formados de forma reversível a partir de ácido indol-3-pirúvico e indol-3-acetaldeído, respectivamente, o triptofano também é convertido em indol-3-acetamida, que dá origem ao ácido indol acético (KOGA; ADACHI; HIDAKA, 1991).

Foi identificado também que a diminuição da concentração de etileno via desaminação microbiana é benéfico para as plantas, causando alongamento do sistema radicular e consequentemente permitindo a planta maior absorção de água e nutrientes, além de promover biocontrole vegetal e o gene que permite a



degradação do precursor de etileno da planta é o *acdS* do carboxilado (ACC) (Tabela 1) (BLAHA et al., 2006; BRUTO et al., 2014). Bactérias com gene *acdS*, assim como o gene *phlD* expressos, podem atuar como promotoras de crescimento vegetal e como agentes de controle biológico de fitopatógenos, e são consideradas uma alternativa ao uso de produtos químicos sintéticos, na produção agrícola (FREITAS; AGUILAR-VILDOSO, 2004). A 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase, metaboliza o ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), quando presente em bactérias promotoras de crescimento pode agir modulando o nível de etileno na planta (MOREIRA; ARAÚJO, 2011). Reduzindo o nível de etileno na germinação de sementes ou estimulando o desenvolvimento radicular melhora a absorção de nutrientes e fertilidade do solo (OZEKI et al., 2010).

O gene *nirK* referente a redutase do nitrito de cobre (Tabela 1), e está presente em um grupo de bactérias desnitrificantes, que tem se mostrado cada vez mais importante, tanto para as plantas quanto para o meio ambiente como um todo, devido à redução de adubos químicos, produzindo produtos finais alternativos (BRAKER et al., 2000; BRUTO et al., 2014). A redução de nitrato ocorre no citosol e envolve a ação da enzima nitrato redutase, produzindo nitrito, o qual adentra aos plasmídeos nas raízes ou cloroplasto em folhas, sendo reduzido à amônia por ação da enzima nitrito redutase, a qual é fixada via glutamato sintase e/ou glutamina sintase nos aminoácidos, glutamina e glutamato por sua vez servem de substrato para reações de trasaminação, para a produção de aminoácidos necessários à síntese de proteínas (DONATO et al., 2004). Bactérias endofíticas que possuem o gene *nirK* são capazes de fazer essa redução de nitrito e disponibilizá-lo para as plantas (SILVA et al., 2011).



## Identification and characterization of growth-promoting bacteria from maize (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture

Tairine G. Ercole<sup>1</sup>, Daiani C. Savi<sup>1</sup>, Douglas Adamoski<sup>1</sup>, Vanessa Merlo Kava<sup>1</sup>, Mariangela Hungria<sup>2</sup>, Lygia V. Galli-Terasawa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210. CEP: 81531-970, Curitiba, PR, Brazil.

<sup>2</sup> Embrapa Soja. CEP: 86001-970, Londrina, PR, Brazil.

\* Corresponding Author: +55 41 33611772; lgterasawa@gmail.com

### ABSTRACT

Limiting factors for plant growth, as nutrient availability and pathogen resistance, impairs the yield of several crops, including maize. Bacteria-plant interaction can mitigate or even circumvent those limitations through beneficial mutual association. A possible source for new plant growth-promoting bacteria (PGPB) is the natural endophytic community since those bacteria co-evolved with their host. This study aimed to evaluate the potential use of a collection of bacteria isolated from maize rhizosphere as formulated inoculants for the same culture. We started with a previously established collection of 413 wild strains and evaluated the genetic diversity using BOX-PCR. For each unique band amplification pattern (or the absence of amplification) we selected a single representative isolated. To identify these bacteria, we performed partial 16S rRNA sequencing and found isolates within *Bacillus* (60% of the isolates), *Lysinibacillus* (30,52%), *Pseudomonas* (3,15%), *Stenotrophomonas* (2,91%), *Enterobacter* (1,70%), *Paenibacillus* (1,22%), *Rhizobium* (0,25%) and *Atlantibacter* (0,25%) genera. The isolate's performance as PGPB were evaluated *in vivo*, accessing the root growth of seedlings emerged from inoculated maize seeds. Eleven isolates with the highest performance were selected for biochemical and molecular analyzes related to growth-promoting. To access relevant pathways possibly related with growth-promoting, we detected key genes in the bacterial genomes, observing presence of *ipdC* (90,9% of the isolates), *pqqC* (54,4%), *nifH* (36,4%) and *nirK* (27,3%), but not *phlD* and *acdS*. Biochemical characterization of the isolates indicated capabilities including biological nitrogen fixation (9,1%), phosphate solubilization (36,6%), siderophore production (54,5%), indol acetic acid production (90,9%). Enzymatic activity against starch (90,1%), cellulose (72,7%), pectin (81,8%), protein (90,9%), chitin (18,2%), urea (54,5%) and ester ligations (45,4%) were also detected. Among these isolates, we found five strains *Bacillus* sp. (LGMB12, LGMB273, LGMB319, LGMB426, LGMB444) and one *Paenibacillus* sp. (LGMB429) with potential do act as formulated inoculants and promote maize plant growth.

**Key words:** Plant Growth Promoting Bacteria. Endophytic Bacteria. Inoculants. *Zea mays* L. BOX-PCR.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is one of the main crops grown in the world (García-Lara; Serna-Saldivar, 2019), Brazil being one of the largest producers of the species, behind only the USA and China (Donley, 2019). Taking into account the intensification of production, high removal of nutrients from agricultural areas, lack of adequate nutritional management for the soil, in addition to the adoption of the monoculture system, the main factors of agriculture are the replacement of nutrients to the environmental and consequently the availability of these to the plant (Figueiredo et al., 2019).

Thus, it is necessary to use fertilizers, especially chemicals, but these usually have high costs and easy loss in the environment, so an option is the use of alternative products, as is the case of endophytic nitrogen fixing bacteria or growth promoters (Harman; Uphoff, 2019).

For maize culture, one of the main limiting factors in the production is the nitrogen (N) deficiency, which directly limits biomass production (Crema, et al., 2019; Carciochi et al., 2020). The use of synthetic nitrogen fertilizers presents restrictions because nitrogen losses occur in the environment, which are caused by the immobilization of the nutrient by bacteria, as well as the possibility of leaching or volatilization of this nutrients (Figueiredo et al., 2019). Therefore, the use of inoculants based on plant growth-promoting bacteria (PGPB) (Azabou et al., 2020) are used to formulate several biological products commercialized worldwide. As a result, the use of inoculants increases productivity (Kour et al., 2019), improves root development and nutrient absorption, which not only reverts to lower production costs due to reduced use of fertilizers, but also leads to reduced environmental damage (Etesami; Alikhani, 2019).

The production of plant growth regulating substance has also been observed in bacteria of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* and *Azospirillum* (Hungria et al., 2010; Videira et al., 2012; Ikeda et al., 2018). There are currently several products on the market based on these bacteria for different cultures, for example *Azospirillum brasilense*

form maize (Pii et al., 2019), *Rhizobium tropici* for bean (Gunnabo et al., 2019), *Bradyrhizobium japonicum* for soybean (Fernandez-Göbel et al., 2019), among others. Thus, it is also observed that there is a certain affinity between bacterial strains and cultivars, regarding the activity of enzymes, accumulated nutrients, natural cycle and growth habit, which confer differences in the growth-promotion (Nehl et al., 1997).

The interaction between bacteria and plants, through direct or indirect mechanisms, can promote vegetal growth (Glick, 2012). Unlike rhizotrophic bacteria, endophytic bacteria are not subject to competition for nutrient that normally occurs in the rhizosphere soil and more efficient in promoting growth (Hassani et al., 2018).

Some key pathways are required to enable the direct growth-promoting and could be assayed by the detection of marker genes such as *nifH* (for nitrogen fixation) or *phlD* (for phloroglucinol synthesis) (Sansinenea, 2019). Indirect pathway could be evaluated as well, using *pqqC*, for example (pyrroloquinoline quinine synthesis) (Sansinenea, 2019). Thus, microorganisms that have the presence of such genes are capable of being used as plant growth promoters (Sansinenea, 2019). Multiple endophytic bacteria showed those characteristics (Ahemad; Kibret, 2014), justifying the growth interest in exploring both growth-promoting and disease biological control, particularly for maize culture (Zuluaga et al., 2020).

This work aimed to evaluate the biotechnological potential of a collection of wild bacteria, isolated from maize roots, to be-used as formulated inoculants to promote the growth of maize. BOX-PCR was used to evaluate the genetic variability of the collection, allowing selection of bacteria to taxonomical identification and evaluation of root growth-promoting, indol acetic acid synthesis, and presence of pathways relevant to both plant growth-promoting and pathogen defense (through biocontrol or induction of systemic resistance). We propose six new isolates with promising effects and candidates to formulation of inoculants to be tested in the maize culture in a field experiment.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Biological Material**

The 413 bacteria used in this study were previously isolated from maize roots (Ikeda et al., 2013) and are deposited at Microorganism Genetics Laboratory (LabGeM), Department of Genetics, UFPR, Brazil.

## **Characterization of Isolates**

### **BOX-PCR**

For the extraction of genomic DNA, the isolates were grown in 3 mL of LB (Luria Bertani) liquid medium for 18 hours at 30 °C, under the agitation of 200 rpm, and the DNA was extracted as described by Szilagyi-Zecchin et al. (2014). DNA quality was assessed by agarose electrophoresis.

The initial characterization of the isolates was performed by BOX-PCR using A1R primer (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', Invitrogen™). The reaction was carried out according to the conditions described by Kaschuk et al. (2006) with adaptations, containing: 200 ng DNA; 10x buffer PCR; 0,5 U/μL Taq DNA polymerase; 0,2 μM primer; 0,2 mM dNTPs; 3 mM MgCl<sub>2</sub>, with a 25 μL final volume. The amplification followed an initial denaturation at 95°C for 7 min.; 35 cycles of 1 min. at 94°C, 1 min. at 53 °C, and 3 min. at 72°C; and final extension of 4 min. at 72 °C.

The amplified fragments were separated by agarose gel 0,7%, electrophoresis in Sodium Borate buffer (Sebestová et al., 2019) pH 8,0. Band pattern was manually defined, the distance between isolates calculated using the Jaccard (J) coefficient (Sneath; Sokal, 1973) using vegan R package (Oksanen et al., 2019) and clustering performed with the bootstrapped UPGMA algorithm (Unweighted Pair-Group Method) as defined in pvclust R package (Suzuki; Shimodaira, 2006). Dendrogram representation was constructed using ggtree R package (Yu et al., 2017; Yu et al., 2018).

## **Phylogenetic Analysis**

The partial sequences of 16S rRNA gene were amplified using fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 e (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') primers (Weisburg et al., 1991). The reaction was carried out according to the

conditions described by Menna et al. (2006) with adaptations. The reaction containing: 200 ng DNA; 10x buffer PCR; 0,5 U/ $\mu$ L Taq DNA polymerase; 0,2  $\mu$ M primer each; 0,2 mM dNTPs; 3 mM  $MgCl_2$ , with a 25  $\mu$ L final volume. The amplification followed an initial denaturation at 95°C for 5 min.; 30 cycles of 45 seg. at 94°C, 45 seg. at 55 °C, and 2 min. at 72°C; and final extension of 10 min. at 72 °C. Obtained fragments were sequenced using Big Dye in ABI3500 DNA Sequencer, as described for Kimoto et al. (2020).

The obtained sequences were compared with sequences available at Bacterio.net (Euzéby, 1997; Parte, 2013; Parte, 2018) using the BLAST tool (Altschul et al., 2005), aligned using Muscle software (Edgar, 2004) and edited using BioEdit software version 7.2.5 (Hall, 1999) and MEGA software version 7 (Kumar et al., 2016). Bayesian phylogenetic trees were generated using MrBayes 3.2.7a (Ronquist et al., 2012), incorporating the evolutionary model indicate after test in the jModel Test software (Guindon; Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012), and performing number of generations required to reach LnL deviation equal to or less than 0.01. Tree visualization was carried out with the aid of FigTree software version 1.4.

## Evaluation of the Promoting Growth Potential

The evaluation growth-promoting potential of each genetic representative obtained in BOX-PCR amplification was carried out in a climatic chamber of plants, fitotron model (Walk-In), with a commercial hybrid cultivar of maize (AG 8780, Agrocere<sup>®</sup>) in triplicate, treated with the carboxin and thiram (Vitavax-Thiram<sup>®</sup>) fungicide and imidacloprid and thiodicarb (Cropstar<sup>®</sup>) insecticide, until full seed coverage. The experimental design was completely randomized. For negative control, seeds without inoculation were used, and for positive control, a commercial formulation containing *Azospirillum brasilense* (AzoTotal<sup>®</sup> - Total Biotecnologia, AbV5/AbV6 strains) was used.

The seeds were inoculated with 1 mL of a solution containing bacteria in the concentration adjusted to  $10^8$  cell  $mL^{-1}$  and planted in vermiculite substrate, two per vase. Thirteen days after planting, the plants were thinning to maintain only one plant per vase. The plants were maintained at an average temperature of 28 °C, with a photoperiod of 12 hours daily. Irrigation of 50 mL per vase was performed daily,

alternating between sterile distilled water and a sterile nutrient solution (Hoagland; Arnon, 1938).

After 30 days the plants were collected, and the root growth was measured with the root scanner (WinRhizo® device). Statistical analyzes were performed using the ANOVA statistical test with Tukey's test at 5% significance.

## Molecular Characterization of Genes Related to Plant Growth Promotion

To identify the presence of growth-promoting pathways in the best candidates from root growth assay, essential genes assayed by PCR (Table 1). Biological nitrogen fixation (*nifH* and *nirK*), phloroglucinol synthesis (*phlD*), phosphate solubilization (*pqqC*), indole acetic acid synthesis (*ipdC*) and ethylene degradation (*acdS*) pathways were evaluated.

Table 1 - Primers used to amplify genes related to plant growth-promoting.

GENE		SEQUENCE (5' - 3')	AMPLIFICATION	REFERENCE
Nitrogenase Reductase	<i>nifH</i> -F	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	1300 pb	Torok; Kondorosi, (1981)
	<i>nifH</i> -R	TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT		
Phloroglucinol Synthase	<i>phlD</i> -F	ACCCACCGCAGCATCGTTTATGAGC	628 pb	Gardener et al., (2000)
	<i>phlD</i> -R	ACCGCCGGTATGGAAGATGAAAAAGTC		
Pyrroloquinoline Quinine Synthase	<i>pqqC</i> -F	CAGGGCTGGGTCGCCAACC	546 pb	Meyer et al., (2011)
	<i>pqqC</i> -R	CATGGCATCGAGCATGCTCC		
Indolepyruvate/ Phenylpyruvate Decarboxylase	<i>ipdC</i> -F	GAAGGATCCCTGTTATGCGAACC	900 pb	Patten; Glick, (2002)
	<i>ipdC</i> -R	CTGGGGATCCGACAAGTAATCAGGC		
Nitrite Reductase	<i>nirK</i> -F	GGMATGGTKCCSTGGCA	514 pb	Braker et al., (1998)
	<i>nirK</i> -R	GCCTCGATCAGRTTRTGG		
1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase	<i>acdS</i> -F	GHGAMGACTGCAAYWSYGGC	792 pb	Blaha et al., (2006)
	<i>acdS</i> -R	ATCATVCCVTGCATBGAYTT		

## Biochemical Evaluation of Parameters Associated with Growth Promotion

To evaluate the biochemical potential and the characterization of enzymatic profile of the isolates, all tests were performed in triplicate.

Regarding the plant growth-promoting, we evaluated the ability of them to produce siderophores that are chelators of iron ions, thus providing Fe in an assimilable way to vegetables (Tank et al., 2012; Ribeiro; Cardoso, 2012); make

phosphorus available from phosphate solubilization by the production of organic acids (Billah et al., 2019; Hamim et al., 2010; Prabhu et al., 2019); conversion of atmospheric nitrogen to assimilable nitrogen by plants (Araújo et al., 2004); and production of phytohormone IAA, which at optimal levels induces root increase (Ghosh et al., 2019; Quiroga et al., 2020).

For enzymatic profile of the isolates, it was tested the capacity to degrade starch, pectin (Hankin; Anagnostakis, 1975, with adaptations), cellulose, chitin (Renwick et al., 1991, with adaptations), and protein (Berg et al., 2002, with adaptations), to transform environmental nitrogen into assimilable for plants, to degrade urea to carbon dioxide and ammonia (Dye, 1968, with adaptations) and to catalyze the reaction of ester bond hydrolysis (Sierra, 1957, with adaptations).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Selection of Isolates using BOX-PCR**

Of the 413 isolates, for 281 isolates band pattern were obtained using BOX-PCR, resulting in 56 different genetic profiles (Figure 1), however for 132 isolates no amplification was observed, what was previously observed for strains isolated from soybean (Judd et al., 1993) and common bean (Mostasso et al., 2002; Kaschuk et al., 2006). Based on this studies representative was chosen at random from each profile and one of those that did not show amplification, resulting in 57 isolates representing the genetic groups.

The use of the BOX-PCR technique in the representation of strains, showed intragenic and intraspecific diversity (Viana et al., 2020), particularly for *Bacillus* genus, which showed multiple distinct band patterns (Figure 1). This technique is especially important when a very large number of isolates is obtained, because through grouping strains with the same extended sequences are joined (Gardan et al., 1999; Marques et al., 2008). Since morphological characteristics in bacteria are not informative, so this technique is the most used techniques for forming groups (Borah et al., 2019).



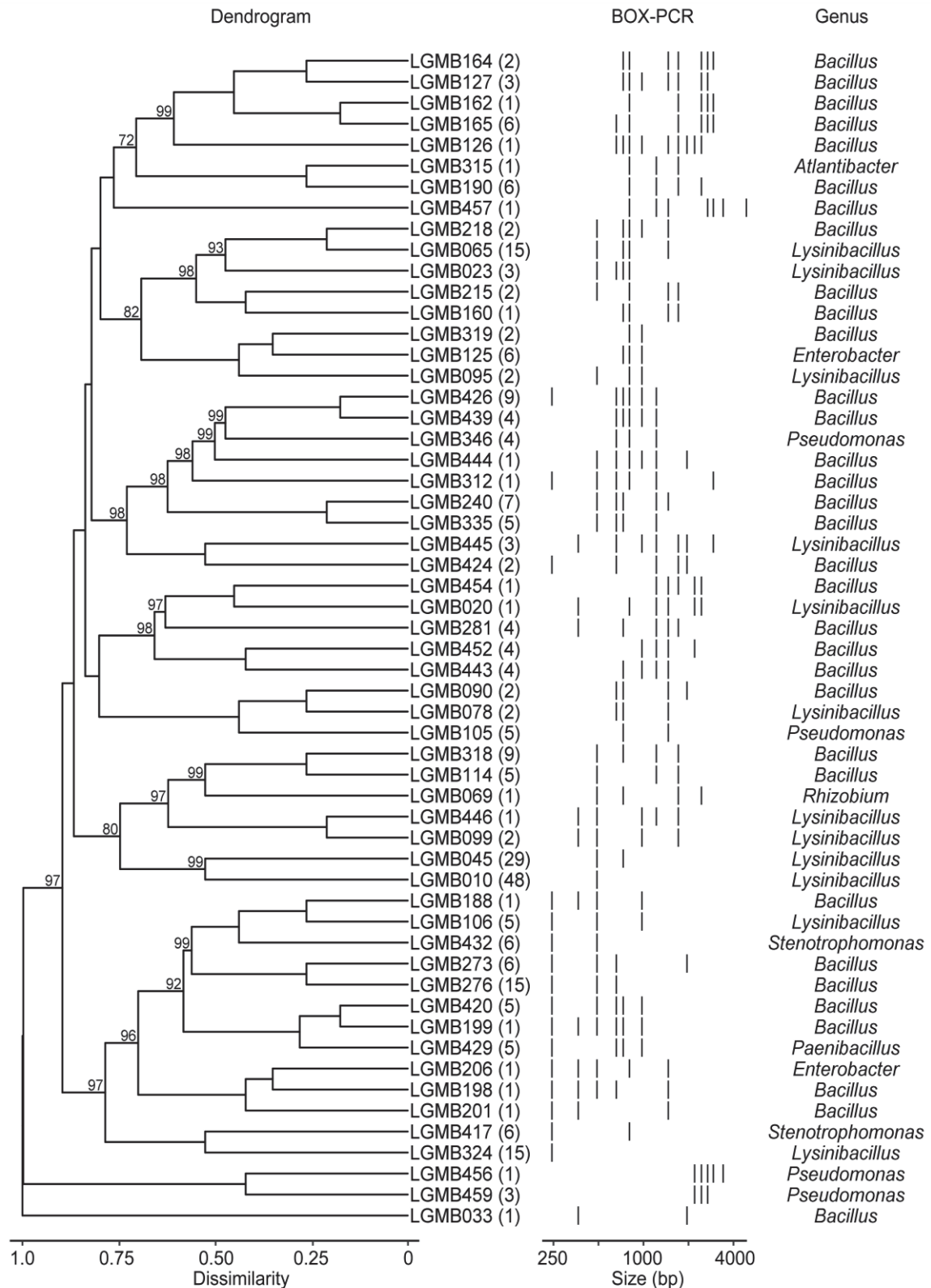


Figure 1 – Dendrogram obtained with BOX-PCR amplification products from maize isolates. Forming 56 different gene profiles. Cluster Analysis using the UPGMA algorithm and Jaccard's coefficient. The number in parenthesis represents the number of isolates with the same genetic profile as the selected LGMB. The number at nodes represent bootstrap support of the clustering when it is above 50%. Genus obtained by partial sequence of the 16S rRNA gene, using Bayesian analysis.



## Phylogenetic Analysis

The 57 selected bacteria were sequenced using the 16S rRNA gene, and phylogenetic analysis using *types strains* were used in the construction of the phylogenetic tree, revealing the diversity of the present genus (Table 2, Figure 2-9).

Table 2. LGMB isolates and their respective genus obtained through phylogenetic analysis, from the sequencing of the 16S rRNA gene.

Genus/Strain	Close Related	Number of Types Strains	Alignment Consisted (pb)	Outgroup
<b><i>Atlantibacter</i></b>				
LGMB315	<i>Atlantibacter hermannii</i>	2	1.417	<i>Salmonella typhimurium</i> (EU014686)
<b><i>Bacillus</i></b>				
LGMB335	<i>Bacillus aerophilus</i>			
LGMB160, LGMB188, LGMB312, LGMB457	<i>Bacillus stratosphericus</i>			
LGMB33, LGMB126, LGMB127, LGMB164, LGMB240, LGMB273, LGMB276, LGMB199	<i>Bacillus invictae</i> , <i>Bacillus zhangzhouensis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>			
LGMB162, LGMB444	<i>Bacillus altitudinis</i> , <i>Bacillus xiamenensis</i>			
LGMB12, LGMB114, LGMB165, LGMB190, LGMB198, LGMB215, LGMB318, LGMB439, LGMB443, LGMB452, LGMB454	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>plantarum</i>	275	1.456	<i>Calidibacillus debilis</i> (NR029016)
LGMB319	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>plantarum</i> , <i>Bacillus methylotrophicus</i> , <i>Bacillus siamensis</i>			
LGMB90, LGMB201, LGMB218, LGMB281	<i>Bacillus subtilis</i>			
LGMB426	<i>Bacillus velezensis</i>			
LGMB420, LGMB424	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			

<b><i>Enterobacter</i></b>				
LGMB206	<i>Enterobacter ludwigii</i>	15	1.229	<i>Serratia marcescens</i> (AJ233431)
<b><i>Lysinibacillus</i></b>				
LGMB10, LGMB20, LGMB23, LGMB45, LGMB65, LGMB78, LGMB95, LGMB99, LGMB106, LGMB324, LGMB445, LGMB446	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	26	1.466	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (D16276)
<b><i>Paenibacillus</i></b>				
LGMB429	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> , <i>Paenibacillus xylanexedens</i> , <i>Paenibacillus tundrae</i>	246	1.465	<i>Bacillus subtilis</i> (AJ276351)
<b><i>Pseudomonas</i></b>				
LGMB105, LGMB459	<i>Pseudomonas azotoformans</i> , <i>Pseudomonas lactis</i> , <i>Pseudomonas paractis</i>	198	1.397	<i>Acinetobacter baumannii</i> (X81660)
LGMB346, LGMB456	<i>Pseudomonas koreensis</i>			
<b><i>Rhizobium</i></b>				
LGMB69	<i>Rhizobium larrymoorei</i>	96	1.333	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (U69638)
<b><i>Stenotrophomonas</i></b>				
LGMB417, LGMB432	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Stenotrophomonas pavanii</i>	17	1.394	<i>Pseudomonas aeruginos</i> (HE978271)

The following genus were identified: *Bacillus* sp. (248 isolates), *Lysinibacillus* sp. (126 isolates), *Stenotrophomonas* sp. (12 isolates), *Pseudomonas* sp. (13 isolates), *Enterobacter* sp. (7 isolates), *Paenibacillus* sp. (5 isolates), *Rhizobium* sp. (1 isolated) and *Atlantibacter* sp. (1 isolated).

Several studies have found bacterial diversity (including *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* e *Enterobacter* genus) among maize root isolates, with the potential to promote growth in plants (Szilagyi-Zecchin et al., 2014; Ikeda et al., 2018; Khan, 2019; Maela; Serepa-Dlamini, 2019).

Bacteria of the *Atlantibacter* genus (Figure 2) are present in the soil population, being endophytic bacteria, but without showing significant prominence for plant growth promotion. Still the *Atlantibacter* genus is little studied concerning plant growth-promoting.

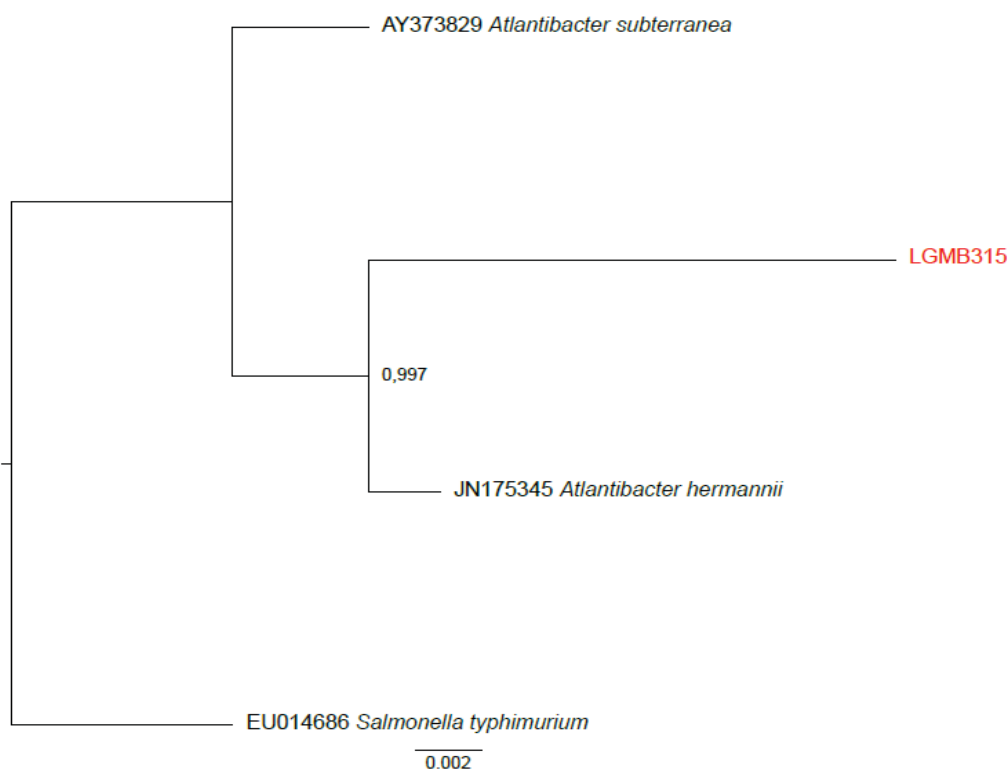


Figure 2 – Bayesian phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB315 and 2 type strains of *Atlantibacter* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Salmonella typhimurium* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database.

Studies show that bacteria of the *Bacillus* genus (Figure 3) can be growth promoters, including *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* and *B. subtilis*, isolated from maize, rice, and soybean plants are known to solubilize insoluble phosphates (Nautiyal et al., 2013; Babu et al., 2017; Borah et al., 2017; Kim et al., 2017; Tiwari et al., 2017; Chinnaswamy et al., 2018).

Bacteria such as *Bacillus edaphiculs* and *Bacillus mucilaginosus* solubilize potassium, reliably releasing plants from minerals available in the soil (Gupta et al., 2015; Satyaprakash et al., 2017). It has also been reported that *Bacillus aryabhattai* and *B. subtilis* rhizobacteria isolated from maize roots have the potential to solubilize insoluble zinc, increasing the biodiversity of this element in the soil (Mumtaz et al., 2017).

*Bacillus pumilus* and *B. subtilis* from roots of maize, has potential to nitrogen fixation, phosphate solubilization, IAA production and significantly used in plant growth-promotion as biofertilizer (Kuan et al., 2016).

Bacteria of the *Enterobacter* genus (Figure 4) promote plant growth through indirect mechanisms, such as the ethylene precursor degradation and promote plant growth under saline stress (Sarkar et al., 2018). It has also been reported that *Bacillus* spp. and *Enterobacter* spp. isolates of iron-enriched soil presented promising candidates of siderophores production (Kumar et al., 2017).

*Enterobacter ludwigii* showed to promote wheat growth under stress conditions by lowering ethylene levels through the production of ACC desaminase enzyme (Zhang et al., 2018). This bacterium when inoculated in tomato seeds showed greater and faster growth of roots, sprouts, hypocotyl and the plants produced more fruits and seeds, besides presenting biocontrol against *Helicoverpa zea* (Pan et al., 2019).

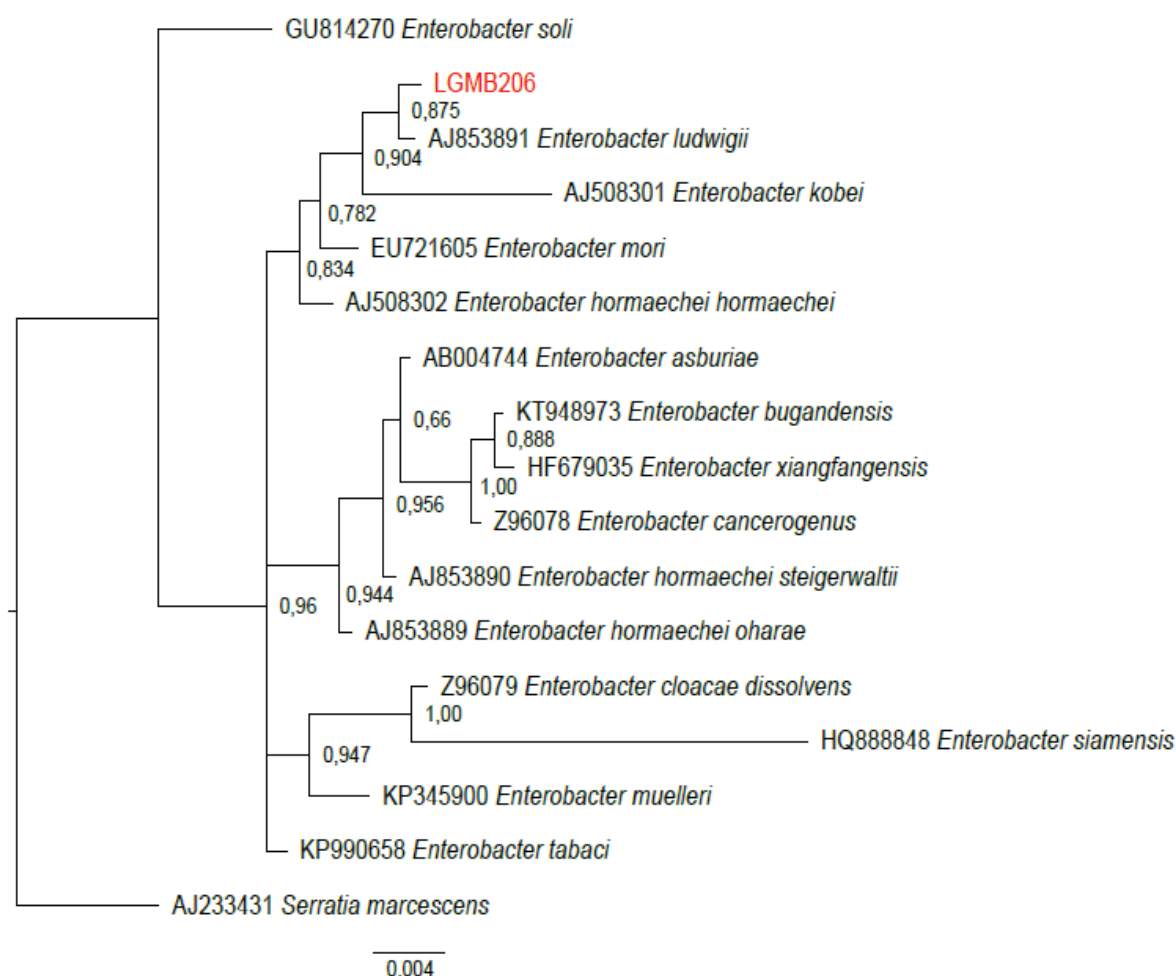


Figure 4 – Bayesian phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB206 and 15 type strains of *Enterobacter* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Serratia marcescens* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database.

Bacteria of the *Lysinibacillus* genus (Figure 5) can be endophytic, in this study the authors characterized that the bacterium *Lysinibacillus sphaericus* has the capacity for biological nitrogen fixation in rice (Shabanamol et al., 2018).

*Lysinibacillus fusiformis* isolated from chickpea roots, produces chitinase that indicates its antagonistic effect against chickpea pathogen, glycolipid type of biosurfactant that inhibits biofilm formation by pathogenic bacteria, also reported the

potential to enhance the growth and yield of wheat cultivars and it can also be used in the remediation of heavy metal contaminated sites (Singh et al., 2013; Pradhan et al., 2014; Gusain et al., 2017).

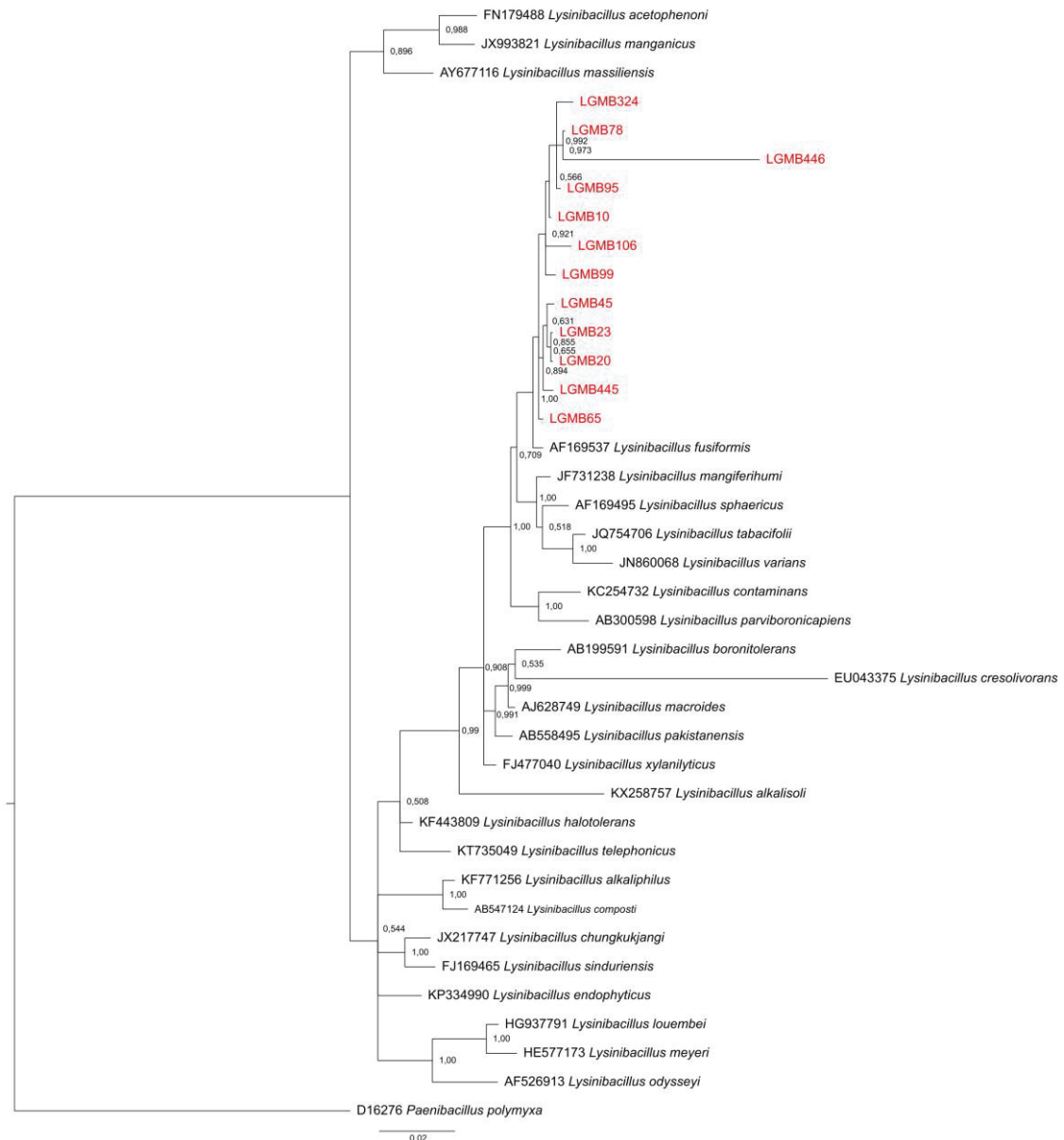


Figure 5 – Bayesian phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB10, LGMB20, LGMB23, LGMB45, LGMB65, LGMB78, LGMB99, LGMB95, LGMB106, LGMB324, LGMB445, LGMB446 and 26 type strains of *Lysinibacillus* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Paenibacillus polymyxa* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database.

Bacteria of *Paenibacillus* genus (Figure 6) can promote plant growth, in addition to the fact that endophytic microorganisms have selectivity for host (plant-specific) (Mayer et al., 2019). *Paenibacillus* sp. also reported the nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophores, and IAA production (Castellano-Hinojosa et al., 2018).



For example, *Paenibacillus polymyxa* known to promote the overall growth of maize plant, possess several PGPB traits including siderophores production, chitinase produced degrade mycelia of various fungal phytopathogens (Padda et al., 2017).

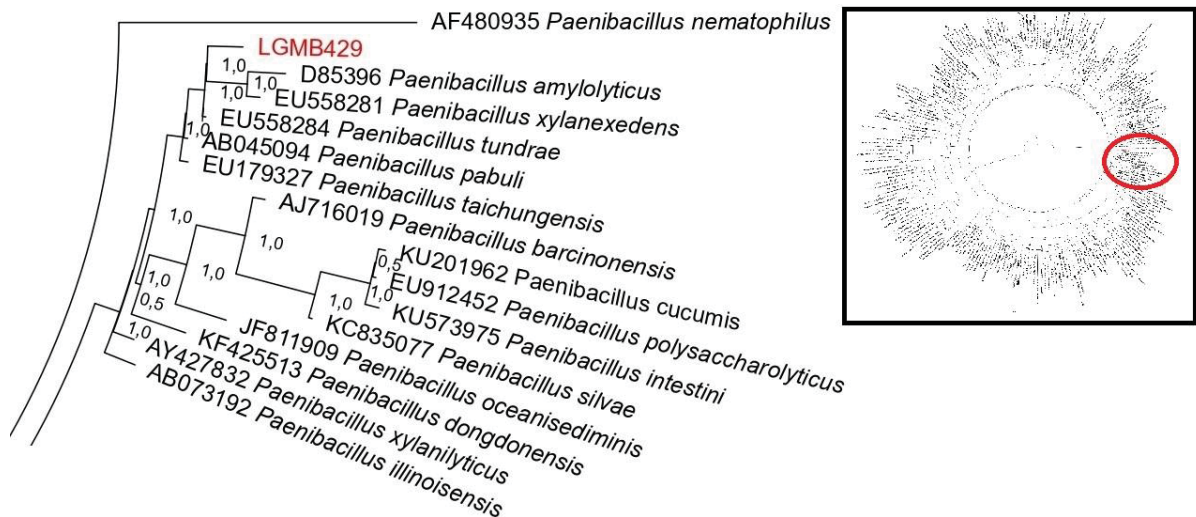


Figure 6 – Bayesian phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB429 and 246 type strains of *Paenibacillus* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Bacillus subtilis* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database.

Genera such as *Pseudomonas* (Figure 7) have also been classified as endophytic. This genus has bacteria that promote plant growth in plants (Rojas-Solís et al., 2018) and usually contains potent producers of IAA in comparison to other bacterial genera (Bharucha et al., 2013; Reetha et al., 2014; Kumar et al., 2015). However, *Pseudomonas fluorescence* has reported a potential role as biocontrol, enhancement in the length of stem and roots, the germination rate of rye, wild barley, and wheat (Heydari et al., 2008).



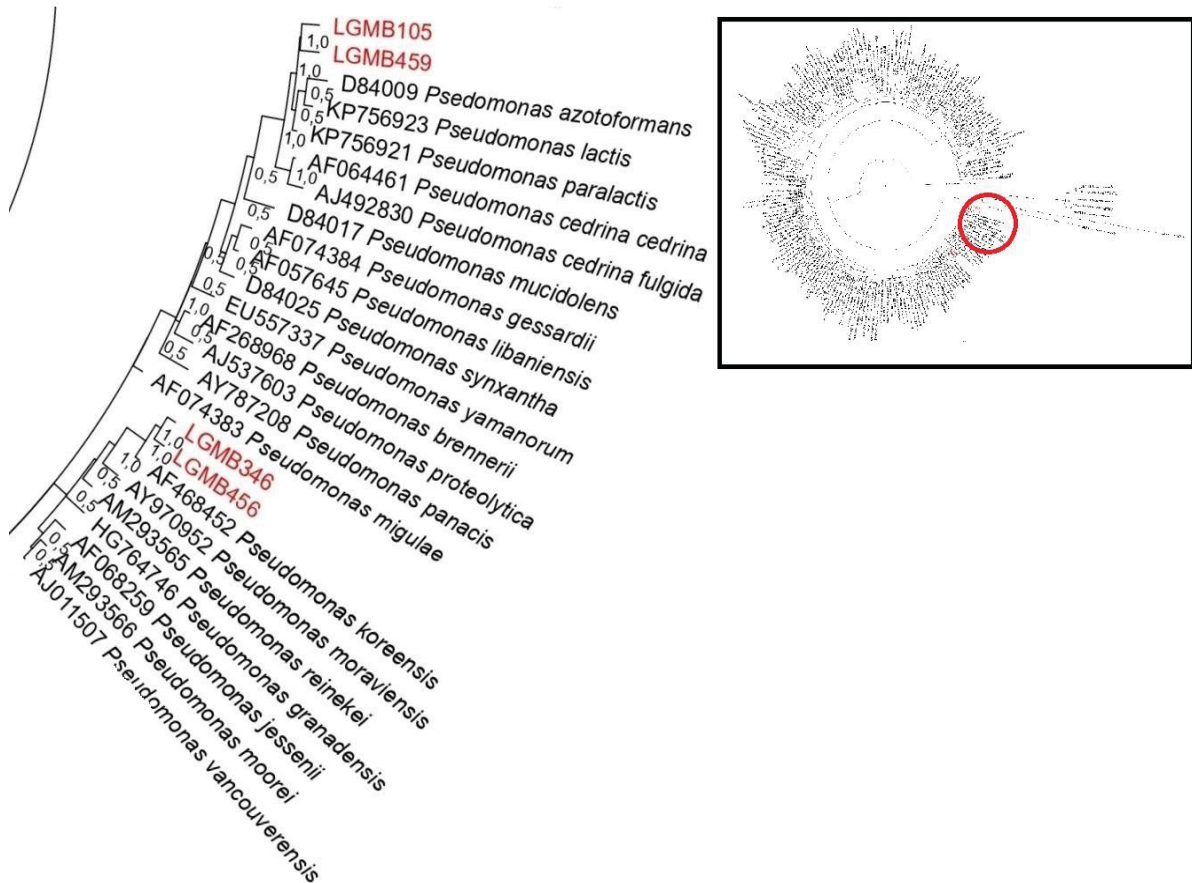


Figure 7 – Bayesian phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB105, LGMB346, LGMB456, LGMB459 and 198 type strains of *Pseudomonas* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Acinetobacter baumannii* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database.

Although *Rhizobium* genus (Figure 8) association had been extensively explored in the root nodules of legumes where they fix atmospheric nitrogen, it was also suggested that *Rhizobium* could exhibit plant growth-promoting (PGPB) activities with non-legumes such as rice (Yanni et al., 1997; Yanni; Dazzo, 2010).

Bacterial genes of *Rhizobium* have been shown that can produce the auxin hormone, which results in better root growth, followed by increase water absorption and nutrient uptake, resulting in increased plant growth (Hernández-Rodríguez et al., 2008; Radha; Rao, 2014). When inoculated in sorghum seeds with *Rhizobium* bacteria not fix the nitrogen in the roots, but the bacterium could naturally increase growth hormones such as auxin, cytokine and riboflavin molecules, oligosaccharides and vitamins, which increased root development and increased absorption of phosphorus (Grönemeyer et al., 2014).

However, the bacteria *Rhizobium larrymoorei* (formerly called *Agrobacterium larrymoorei*) is a pathogen isolated from aerial tumors of *Ficus benjamina* (Bouzar; Jones, 2001).

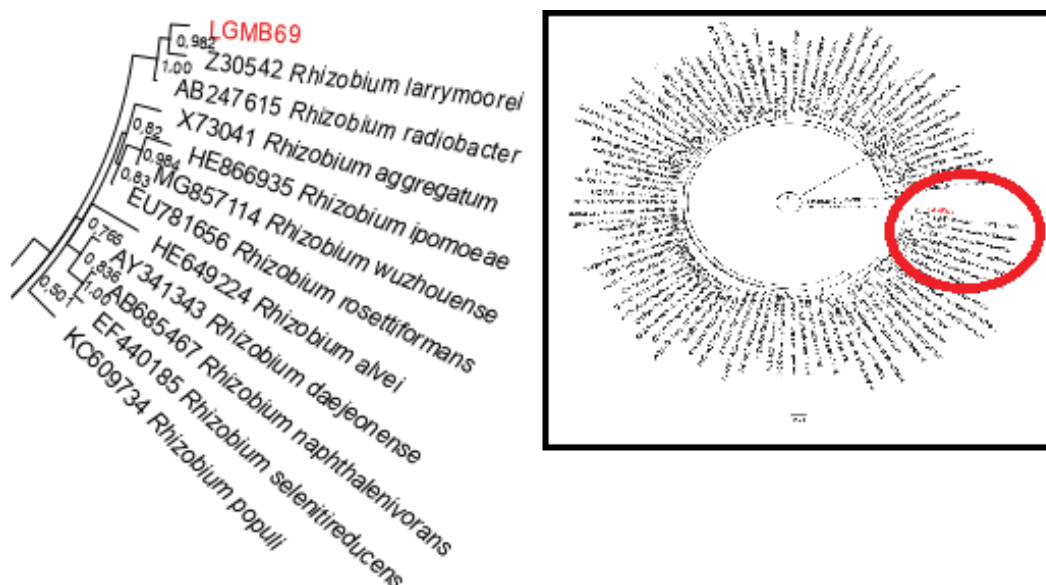


Figure 8 – Bayesian phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB69 and 96 type strains of *Rhizobium* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Bradyrhizobium japonicum* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database.

Among various plant growth promoting rhizobacteria, *Stenotrophomonas* (Figure 9) is one of versatile PGPB candidate which have a multifarious trait, prevalent in various ecological niches and species like *S. rhizophila* and *S. maltophilia* usually reported to isolated from endosphere (plant internal tissue) and rhizosphere soil which showed various plant growth promoting activities (Karagöz et al., 2012; Denet et al., 2018). The genus *Stenotrophomonas* also plays a significant role in the biogeochemical cycles like sulphur and nitrogen (Banerjee; Yesmin, 2002; Park et al., 2005; Ramos et al., 2011).

Many reports are affirming the capacity of *Stenotrophomonas* species to produce different forms of siderophores (Chhibber et al., 2008; Ryan et al., 2009). It was also portrayed that *Stenotrophomonas pavanii* can dissolve phosphate, produce indole acetic acid hormone, and stimulate rice seed growth, therefore, so they were considered as potential biological agents for controlling plant pathogens (Rahma et al., 2019).

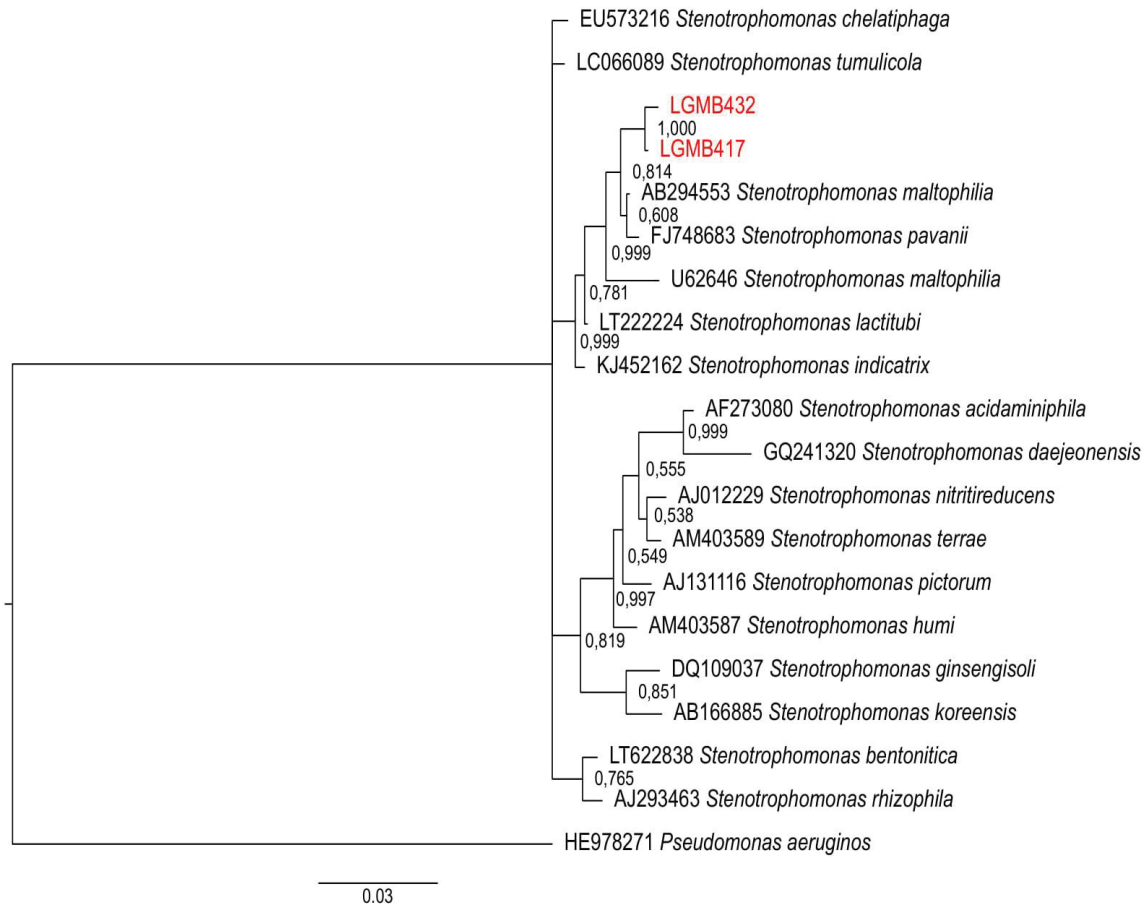


Figure 9 – Bayesian phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of LGMB417, LGMB432 and 17 type strains of *Stenotrophomonas* genus. Values on the node indicate Bayesian posterior probabilities. The species *Pseudomonas aeruginos* was used as outgroup. Scale bar indicates the number of substitutions per site. The accession codes refer to the GenBank database.

However, some of the genus found are described as pathogenic bacteria in humans (*Lysinibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Atlantibacter*). The use of bacteria that contain pathogenic species to humans in their genus is disregarded, as it may present risks of spreading these bacteria to the environment. Therefore, care is critical with microbial manipulation, since at first, the microbial diversity of the soil is unknown (Benami et al., 2013).

### Evaluation of the Potential for Growth Promotion

For *in vivo* evaluation, maize plants were grown under controlled experimental conditions in a climatic chamber. They were inoculated with 57 isolated bacteria, and after 30 days from seeding, the plants were collected for root growth analysis.

The results of the statistical analysis showed significance for the dry weight of the plants (g) (CV% = 49,87) (Figure 10), total root length (cm) (CV% = 49,06)

(Figure 11) and root length from 0 to 0,5 mm in diameter (cm) (CV% = 58,23) (Figure 12). For the wet weight of the plant (g) (CV% = 31,18), total root volume (cm<sup>3</sup>) (CV% = 41,70) and the average root diameter (mm) (CV% = 11,27), there was no statistical difference in Tukey test, at 5% significance.

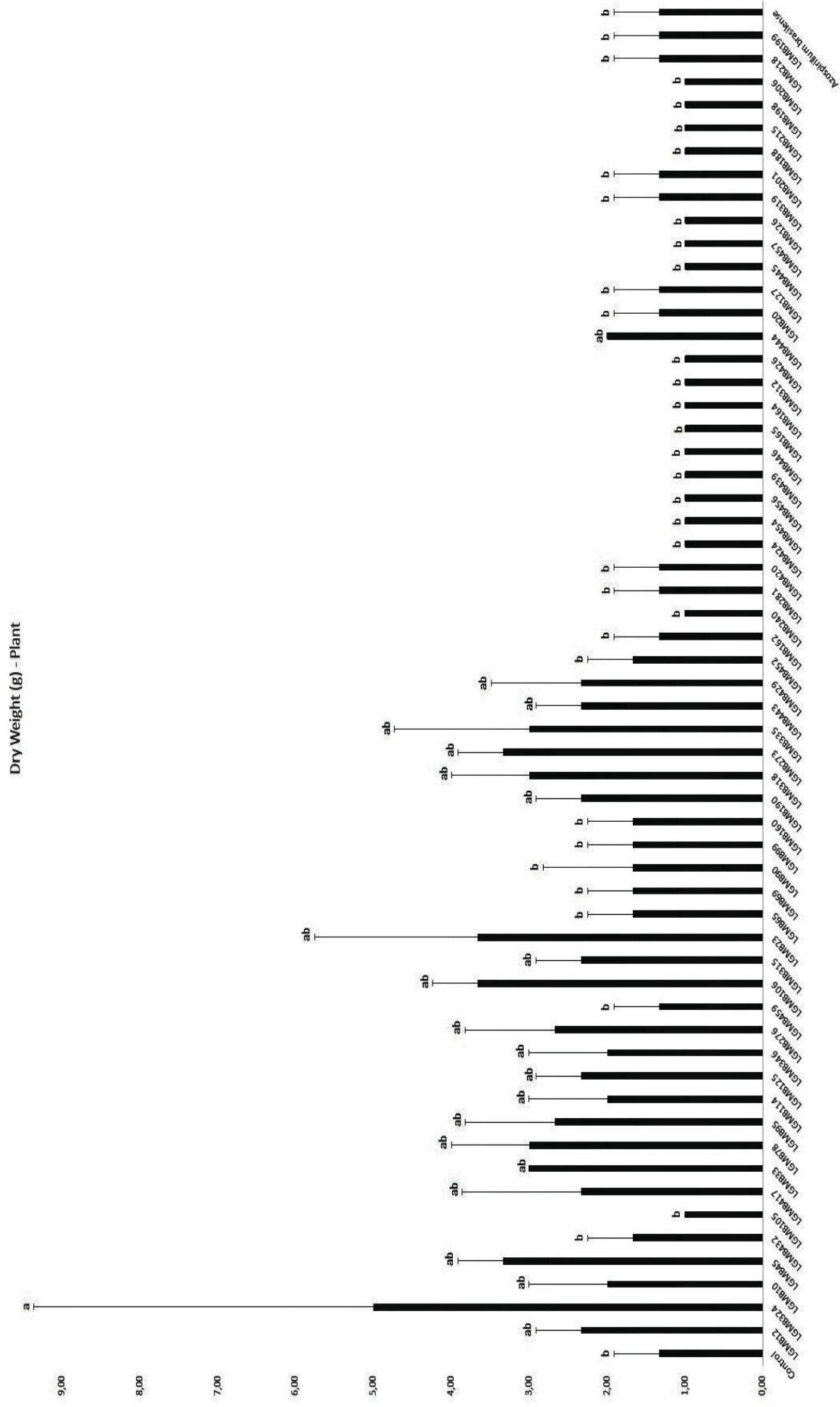


Figure 10 – Dry weight of maize plants (in grams) of the 57 bacterial isolates (LGMb). Evaluating growth promotion parameters, after 30 days of inoculation in maize seeds, in a climatic chamber of plants. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD.

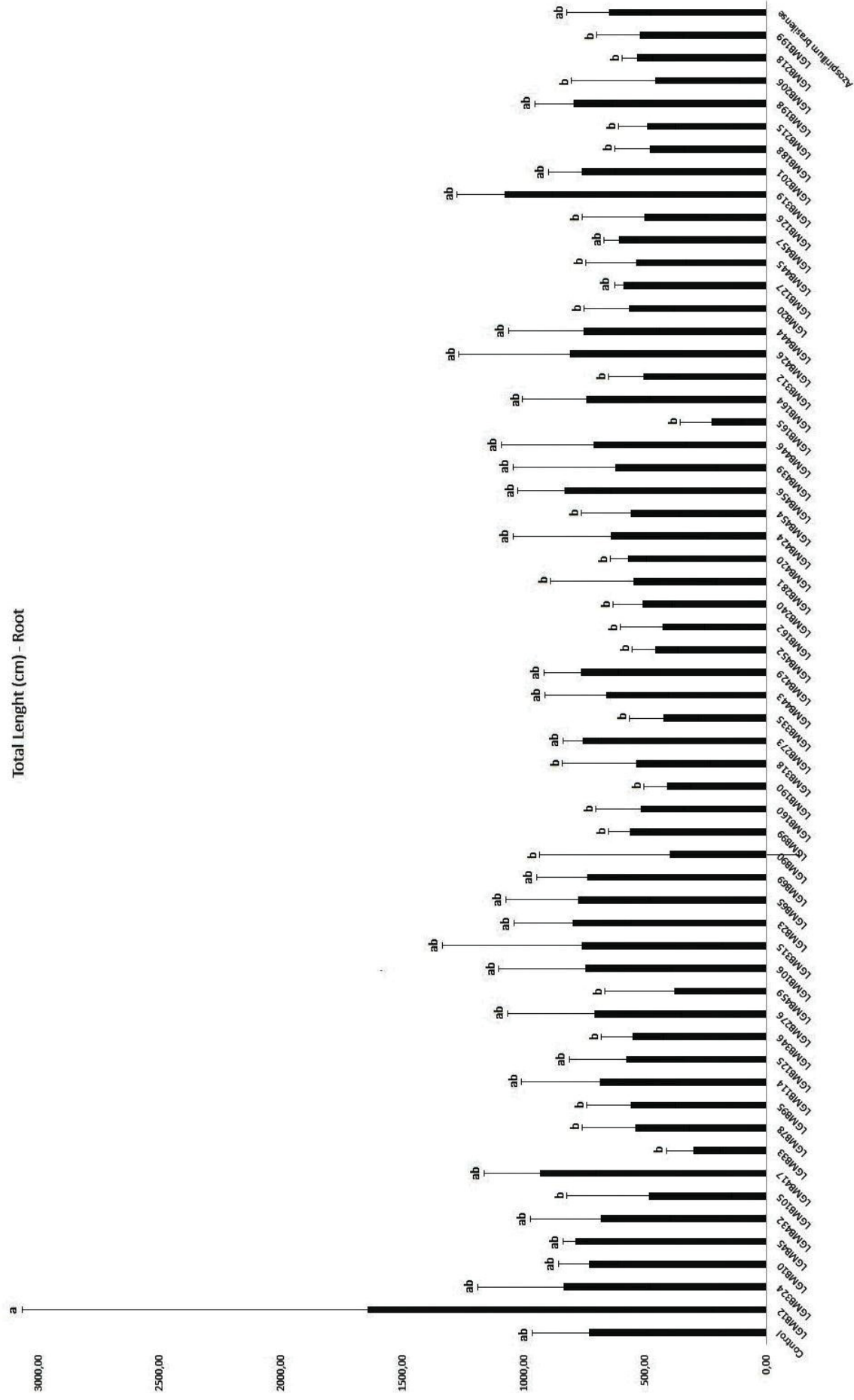


Figure 11 – Total root length of maize (in centimeters) of the 57 bacterial isolates (LGMb). Evaluating growth promotion parameters, after 30 days of inoculation in maize seeds, in a climatic chamber of plants. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD.

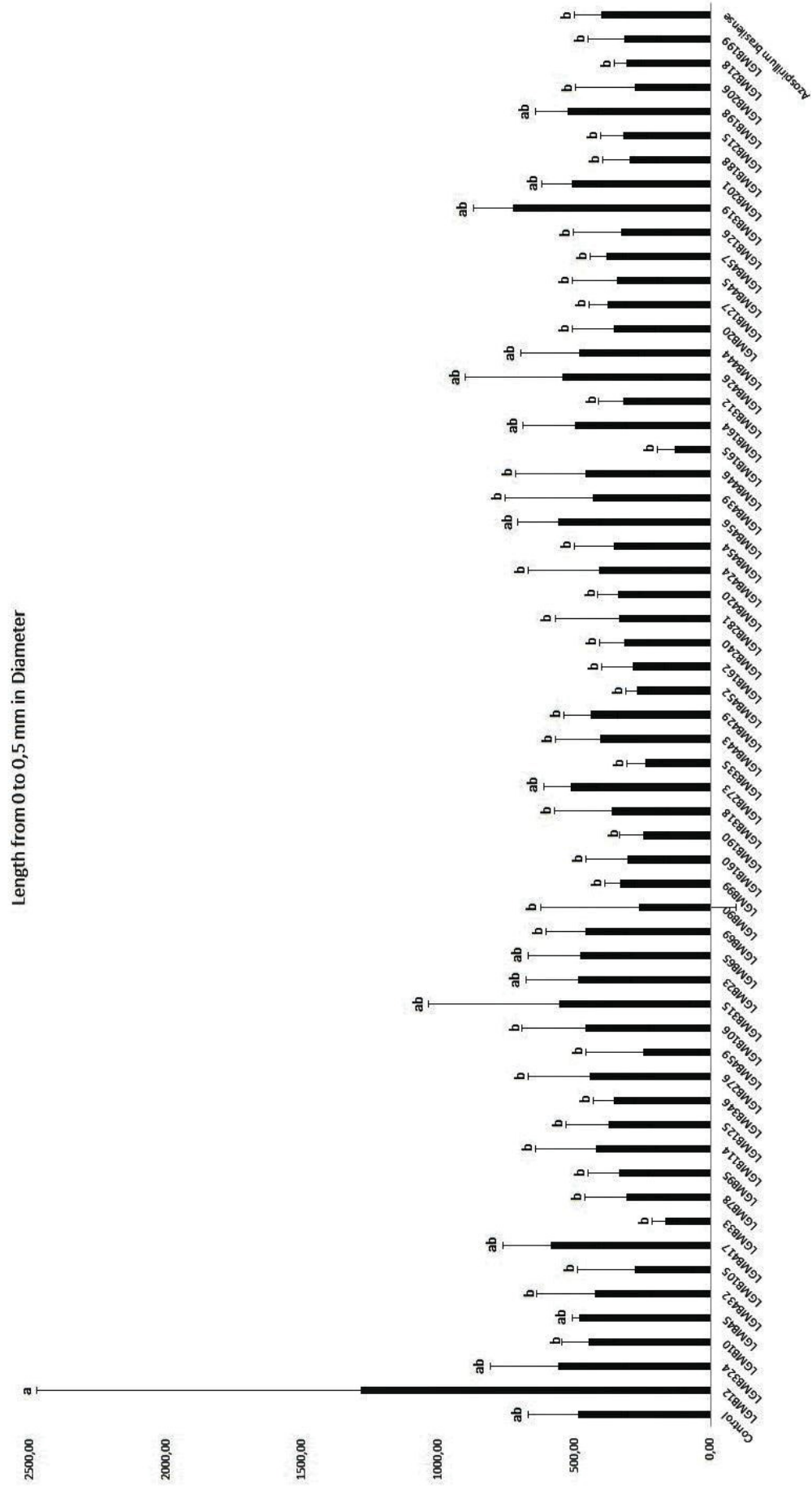


Figure 12 – Total length of roots of maize from 0 to 0,5 mm in diameter (in centimeters) of the 57 bacterial isolates (LGMB). Evaluating growth promotion parameters, after 30 days of inoculation in maize seeds, in a climatic chamber of plants. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD.



From the plants growth in a plant growth chamber, statistical analysis was performed selecting the isolates that showed significance for the three parameters (dry weight, total root length and total length of roots from 0 to 0,5 mm in diameter) were LGMB12, LGMB273 and LGMB444 (*Bacillus*), LGMB23, LGMB45 and LGMB324 (*Lysinibacillus*), LGMB417 (*Stenotrophomonas*). The LGMB319 and LGMB426 (*Bacillus*), LGMB429 (*Paenibacillus*) and LGMB456 (*Pseudomonas*) were also selected, where these showed significance for two parameters and obtained an average higher than 800 centimeters in the total length of roots.

Root increasement affects nutrient absorption, and the root length have been used as an indicator of the efficiency of nutrient interception and acquisition by the plant (Su et al., 2019). Lager roots are generally beneficial for nutrient absorption, leading to higher shoot biomass (Li et al., 2017; Duan, 2019). In this way, the eleven isolates with great results were selected to the evaluated of the presence of routs relate to plant growth-promoting.

### **Evaluation of Parameters Related to Growth Promotion**

For the detection of the presence of genes and biochemical tests, the 11 bacteria with the best performance in the climatic chamber were used, in order to determinate possible routes involved in the plant growth-promoting.

Molecular results obtained (Table 3) for the presence of marker gene for phosphate solubilization gene (*pqqC*) show that 54,5% of the isolates contains the gene *pqqC* and were able to phosphate solubilization in the biochemical test. An alternative for agrochemicals would be the bacteria that solubilize phosphate, as observed a large part of these solubilizers are found in the soil (Lobo et al., 2019; Gao et al., 2019). The results indicate that a good part of the tested bacteria collection has a real capacity to increase the plant nutrition by making phosphorous available through the solubilization of inorganic phosphate.

The gene responsible for biological nitrogen fixation (*nifH*), is found in 36,4% of the isolates and the *nirK* gene responsible for the degradation of nitrogenase in 27,3% of the isolates. Several genera of bacteria have been proven to be related to biological nitrogen fixation routes (Kour et al., 2019). According to Kour et al. (2019), such as *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* genus are among these bacteria, corroborating the present work (Table 3). For biological nitrogen, in the



biochemical test (Table 3), the isolates did not show significant performance, and only LGMB417 isolates had this characteristic. Plant growth promoting bacteria do not always can fix nitrogen, they can be PGPB through other processes (Aquino et al., 2019).

Biochemical production (Table 3) is also one of the main factors of plant growth, such as the production of siderophore which is extremely important, as iron is a cofactor of enzymes that participate in several biochemical routes of physiological processes in the plant, such as respiration, photosynthesis and biological nitrogen fixation (Sansinenea, 2019). Among the 11 isolates selected, 6 of them presented the production of siderophore, which shows that isolates that produce siderophore have great importance in the context of plant growth, since they act directly on the availability of iron for the plant and indirectly on antibiosis to phytopathogenic microorganisms.

Table 3 – Presence or absence of the gene and biochemical tests (Bioch.) in the isolates with the best performance in plant climatic chambers.

Isolated	Genus	Phosphate Solubilization		Indol Acetic Acid		Biological Nitrogen Fixation			Siderophore Production
		<i>pqqC</i>	Bioch.	<i>ipdC</i>	Bioch.	<i>nifH</i>	<i>nirK</i>	Bioch.	
LGMB12	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	-	-	+
LGMB273	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+
LGMB429	<i>Paenibacillus</i>	-	-	+	+	+	+	-	-
LGMB426	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
LGMB444	<i>Bacillus</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
LGMB319	<i>Bacillus</i>	-	-	+	+	-	-	-	+
LGMB324	<i>Lysinibacillus</i> *	-	-	+	+	-	-	-	+
LGMB45	<i>Lysinibacillus</i> *	-	-	+	+	-	+	-	-
LGMB417	<i>Stenotrophomonas</i> *	+	+	+	+	+	-	+	-
LGMB23	<i>Lysinibacillus</i> *	+	+	+	+	-	-	-	-
LGMB456	<i>Pseudomonas</i> *	+	+	+	+	-	-	-	-

\*Genera with pathogenic species of humans.

The *ipdC* gene from the precursor of indole acetic acid, is present in 90,9% of the isolates, and for each isolated production varies. except in the isolated LGMB444, whose production is very low, this may be due to a residue present in the bacteria (Defez et al., 2019). Like Maela et al. (2019) exhibit in their work bacteria of the *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* genus, among others, have the capacity of phytohormone IAA production. Of the 11 isolates selected (Figure 13), LGMB45

showed higher production of IAA, but not significantly differentiating from LGMB23, LGMB324 and LGMB456, thus showing that the production of IAA in this collection is of great importance. According to Mayer et al. (2019), rhizobacteria promoting indole acetic acid are easily isolated from the soil for use in agriculture as a biofertilizer. The IAA can stimulate processes of cell stretching, division and differentiation (Mayer et al., 2019).

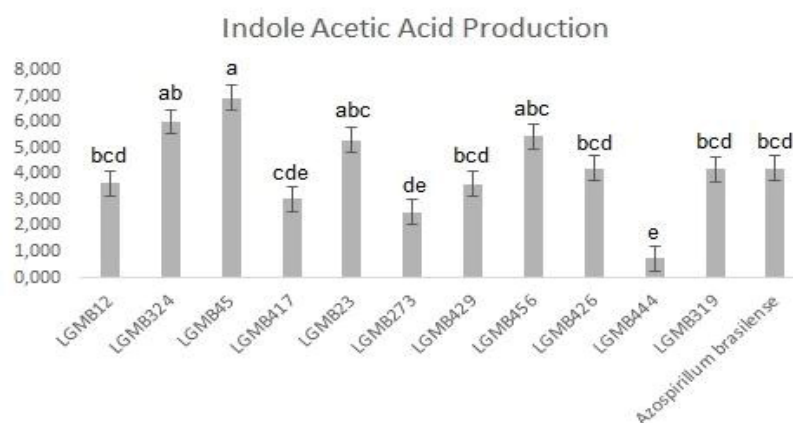


Figure 13 – Activity to promote root growth in maize plants with 11 bacterial isolates and positive control (*Azospirillum brasilense*). Quantification of indole acetic acid. Tukey test, at 5% significance. Error bars SD.

The bacteria did not present the presence of the *phlD* and *acdS* genes, responsible for the synthesis of phloroglucinol and the gene that allows the degradation of the plant's ethylene precursor, respectively. The *acdS* gene as well as the *phlD* gene, act as indirect plant growth promoters, promoting biological control of phytopathogens (Glick et al, 2007; Hernández-León et al., 2015).

## Biotechnological Applications

The enzymatic profile (Table 4) showed that 90,1% of the isolated can produce amylase. Amylases represent one of most important groups of enzymes, as they have several applications in the industry, such as in the food, textile, pharmaceutical and detergent chemicals industries (Hassan et al., 2006; Souza; Magalhães, 2010). For the urease test, 54,5% of the isolates potentially to degrade urea.

As for cellulase production 72,7% of the isolates showed a positive result. For chitinase production 18,2% of the isolates have the ability. A total of 81,8% of the isolates are capable of pectinase production, 90,9% of the isolates produce protease

and 45,4% of the selected bacteria produce esterase. Hydrolytic enzymes, such as cellulase (Tang et al., 2020), chitinase (Asraoui et al., 2019), pectinase (Kumar; Singh, 2020), protease (Mouayed et al., 2019) and esterase (Shah et al., 2019) that are produced by microorganisms, can interfere with the growth and activities of pathogens, and thus can be considered as biocontrol agents, an indirect mechanism for plant growth promoting (Bull et al., 2002; Malusà et al., 2016).

Table 4 – Presence or absence of biochemical tests for enzyme production in isolates with the best performance in plant climatic chambers.

Isolated	Genus	Amylase	Cellulase	Pectinase	Chitinase	Urease	Esterase	Protease
LGMB12	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-	-	+
LGMB273	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	-	+
LGMB429	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	-	-	-	-
LGMB426	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-	-	+
LGMB444	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+	+
LGMB319	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-	-	+
LGMB324	<i>Lysinibacillus</i> *	+	-	-	-	+	-	+
LGMB45	<i>Lysinibacillus</i> *	+	-	-	-	+	-	+
LGMB417	<i>Stenotrophomonas</i> *	+	+	+	-	+	+	+
LGMB23	<i>Lysinibacillus</i> *	-	-	-	-	-	+	-
LGMB456	<i>Pseudomonas</i> *	+	+	+	-	+	+	+

\*Genera with pathogenic species of humans.

## CONCLUSION

In this study, we explored the bacterial community isolated from roots of maize in order to evaluate their capacity for growth promoting. Sequencing revealed the presence of the *Atlantibacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Stenotrophomonas* genus. Eleven bacteria were highlighted *in vivo* testing. Among these, six isolated LGMB12, LGMB273, LGMB319, LGMB426, LGMB444 (*Bacillus* sp.) and LGMB429 (*Paenibacillus* sp.), they are the best because they do not present pathogenic species for human in the genera, and showed the highest potential for growth-promoting in maize culture, due to the biochemical and enzymatic characteristics of the strains.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Vértika Agropecuária Ltda, Total Biotecnologia Ltda and EMBRAPA Soja for the material made available to carry out this work. And also, Phytopathology Department – UFPR Agrárias provide space to develop part of the

work. This work was financed by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and by INCT 16/2014 (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia) program.

## REFERENCES

- Ahemad, M.; Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **J. King Saud. Univ. Sci.** 26. 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Altschul, S. F.; Wootton, J. C.; Gertz, E. M.; Agarwala, R.; Morgulis, A.; Shäffer, A. A.; Yu, Y-K. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **The FEBS Journal.** 272. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>.
- Aquino, J. P. A. de; Macedo Júnior, F. B. de; Antunes, J. E. L.; Figueiredo, M. do V. B.; Alcântara Neto, F. de; Araújo, A. S. F. de. 2019. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum. **Pesqui. Agropecu. Trop.** 49. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4956241>.
- Araújo, L. M.; Monteiro, R. A.; Souza, E. M.; Steffens, M. B. R.; Rigo, L. U.; Pedrosa, F. O.; Chubatsu, L. S. 2004. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.** 155, 491-495. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.03.002>.
- Asraoui, M.; Zanella, F.; Marcato, S.; Squartini, A.; Amzil, J.; Hamdache, A.; Baldan, B.; Ezziyyani, M. 2019. *Bacillus amyloliquefaciens* enhanced strawberry plants defense responses, upon challenge with *Botrytis cinerea*. **Advan. Intel. Sys. Sustain. Devel.** 3. 46-53. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11898-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11898-5_5).
- Azabou, M. C.; Gharbi, Y.; Medhioub, I.; Ennouri, K.; Barham, H.; Tounsi, S.; Triki, M. A. 2020. The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against *Verticillium* wilt of olive and potential plant growth promoting bacteria. **Biological Control.** v. 142. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104168>.
- Babu, S. V.; Triveni, S.; Reddy, R. S.; Sathyanarayana, J. 2017. Screening of maize rhizospheric phosphate solubilizing isolates for plant growth promoting characteristics. **J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 6. 2090-2101. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.249>.
- Banerjee, M.; Yesmin, L. 2002. Sulfur-oxidizing plant growth promoting rhizobacteria for enhanced canola performance. **US Patent 07491535**.
- Benami, M.; Gross, A.; Herzberg, M.; Prlofsky, E.; Vonshak, A.; Gillor O. 2013. Assessment of pathogenic bacteria in treated graywater and irrigated soils. **Sci. Total Environ.** 458-460, 298-302. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.023>.

- Berg, G.; Roskot, N.; Steidle, A.; Eberl, L.; Zock, A.; Smalla, K. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 68. 3328-3338. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3328-3338.2002>.
- Bharucha, U.; Patel, K.; Trivedi, U. B. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). **Agric. Res.** 2. 215-221. <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>.
- Billah, M.; Khan, M.; Bano, A.; Hassan, T. U.; Munir, A.; Gurmani, A. R. 2019. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. **Germicrobiol. J.** 36. 904-916. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>
- Blaha, D.; Prigent-Combaret, C.; Mirza, M. S.; Moënne-Loccoz, Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiol. Ecol.** 3, 455-470. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00082.x>.
- Borah, M.; Das, P.; Pathak, S. S.; Boro, R. C.; Barooah, M. 2017. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from *Oryza sativa*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 6. 2713-2721. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.319>.
- Borah, A.; Das, R.; Mazumdar, R.; Thakur, D. 2019. Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics. **J. Appl. Microbiol.** 127. 825-844. <https://doi.org/10.1111/jam.14356>.
- Bouzar, H.; Jones, J. B. 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. Nov. a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. **Int. J. Sys. Evol. Microbiol.** 51, 1023-1026. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1023>.
- Braker, G.; Fesefeldt, A.; Witzel, K. P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** 64, 3769-3775. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3769-3775.1998>.
- Bull, C. T.; Shetty, K. G.; Subbarao, K. V. 2002. Interactions between Myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. **Plant Disease.** 86, 889-896. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.8.889>.
- Carciochi, W. D.; Sadras, V. O.; Pagani, A.; Ciampitti, I. A. 2020. Co-limitation and stoichiometry capture the interacting effects of nitrogen and sulfur on maize yield and nutrient use efficiency. **Eur. J. Agron.** 113. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125973>.
- Castellano-Hinojosa, A.; Pérez-Tapia, V.; Bedmar, E. J.; Santilana, N. 2018. Purple corn associated rhizobacteria with potential for plant growth promotion. **J. Appl. Microbiol.** 124. 1254-1264. <https://doi.org/10.1111/jam.13708>.

- Chhibbe, S.; Gupta, A.; Sharan, R.; Gautam, V.; Ray, P. 2008. Putative virulence characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia*: a study on clinical isolates. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24. 2819-2825. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9812-5>.
- Chinnaswamy, A.; Peña, T. C. de la.; Stoll, A.; Rojo, D. de la P.; Bravo, J.; Ricón, A.; Lucas, M. M.; Pueyo, J. J. 2018. A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. **An. Appl. Biol.** 172, 295-308. <https://doi.org/10.1111/aab.12420>.
- Crema, A.; Vandini, G.; Boschetti, M.; Nutini, F.; Cillis, D.; Casa, R. 2019. Interaction between soil variability and maize nitrogen status assessment from Sentinel-2. **Precis. Agric.** 453-459. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-888-9\\_56](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-888-9_56).
- Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo, R.; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods.** 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- Defez, R.; Valenti, A.; Andreozzi, A.; Romano, S.; Ciaramella, M.; Pesaresi, P.; Fornali, S.; Bianco, C. 2019. New insights into structural and functional roles of indole-3-acetic acid (IAA): changes in DNA topology and gene expression in bacteria. **Biomolecules.** 9. 522. <https://doi.org/10.3390/biom9100522>.
- Denet, E.; Vasselon, V.; Burdin, B.; Nazaret, S.; Favre-Bonte, S. 2018. Survival and growth of *Stenotrophomonas maltophilia* in free-living amoebae (FLA) and bacteria virulence properties. **PLoS One.** 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192308>.
- Donley, N. 2019. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environ. Health.** 44. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0488-0>.
- Duan, P. F. 2019. Response of maize genotypes with different nitrogen use efficiency to low nitrogen stresses. **Acta. Ecologica. Sinica.** 39, 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.05.005>.
- Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia* 1 The “amylovora” group. *New Zeal Jour. Scien.*, 11. 590-607. <https://doi.org/10.1080/00288233.1981.10420894>.
- Edgar, R. C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.** 32, 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Etesami, H.; Alikhani, H. A. 2019. Halotolerant plant growth-promoting fungi and bacteria as an alternative strategy for improving nutrient availability to salinity-stressed crop plants. In: Kumar, M.; Etesami, H.; Kumar, V. (eds) **Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms**. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9_5).



Euzéby, J. P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 47, 590-592. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>.

Fernandez-Göbel, T. F.; Deanna, R.; Muñoz, N. B.; Robert, G.; Asurmendi, S.; Lascano, R. 2019. Redox Systemic signalong and induced tolerance responses during soybean – *Bradyrhizobium japonicum* interaction: involvement of nod factor receptor and autoregulation of nodulation. **Front. Plant Sci.** <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00141>.

Figueiredo, L. H. M.; Vasconcellos, A. G.; Prado, G. S.; Grossi-de-Sa, M F. 2019. Na overview of intellectual property within agricultural Biotechnology in Brazil. **Biotechnol. Res. Innov.** 3. 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.04.003>.

Gao, J.; Luo, Y.; Wei, Y.; Huang, Y.; Zhang, H.; He, W.; Sheng, H.; An, L. 2019. Screening of plant growth promoting bacteria (PGPB) from rhizosphere and bulk soil of Caragana microphylla in different habitats and their effects on the growth of Arabidopsis seedlings. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.** 33. 921-930. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1629841>

García-Lara, S.; Serna-Saldivar, S. O. 2019. Corn History and Culture. **Chem. Technol.** 1-18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00001-2>.

Gardan, L.; Shafik, H.; Belouin, S.; Brosch, R.; Grimont, F.; Grimont, P. A. D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabiana* sp. nov. (ex. Sutic and Dowson 1959). **Int. J. Syst. Bacteriol.** 49. 469-478. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-469>.

Gardener, B. B. M.; Mavrodi, D. V.; Thomashow, L. S.; Weller, D. M. 2000. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucionol-producing bacteria. **J. Phytopathol.** 91, 44-54. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.44>.

Ghosh, D.; Gupta, A.; Mohapatra, S. A comparative Analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on osmotic-stress mitigation in *Arabidopsis thaliana*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 35. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2659-0>.

Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Hindawi Publishing.** 2012. 1-15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.

Glick, B. R.; Todorovic, B.; Czarny, J.; Cheng, Z.; Duan, J.; McConkey, B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Crit. Rev. Plant Sci.** 26. 227-242. <https://doi.org/10.1080/07352680701572966>.

Grönemeyer, J. L.; Kulkarni, A.; Berkelmann, D.; Hurek, T.; Reinhold-Hurek, B. 2014. Rhizobia indigenous to the Okavango region in sub-saharan Africa: diversity, adaptations, and host specificity. **Appl. Environ. Microbiol.** 80. 7244-7257. <https://doi.org/10.1128/AEM.02417-14>.

Guindon S.; Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Syst. Biol.** 52. 696-704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>.

Gunnabo, A. H.; Geurts, R.; Wolde-Meskel, E.; Degefu, T.; Giller, K. E.; Heerwaarden, J. Van. 2019. Genetic interaction studies reveal superior performance of *Rhizobium tropici* CIAT899 on a range of diverse east African common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Environ. Microbiol.** <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-19>.

Gupta, G.; Parihar, S. S.; Ahirwar, N. K.; Snehi, S. K.; Singh, V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **J. Microb. Biochem. Technol.** 7. 96-102. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>.

Gusain, P.; Paliwal, R.; Singh, V. 2017. Rhizoremediation of cadmium-contaminated soil associated with hydroxamate siderophores isolated from cd-resistance plant growth promoting *Dietzia maris* and *Lysinibacillus* strains. **Int. J. Phytoremediat.** 19. 290-299. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1225281>.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series.** v. 41, p. 95 - 98. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14998u1.29](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29).

Hamim, A.; Boukeskase, A.; Ouhdouch, Y.; Farrouki, A.; Barrijal, S.; Miché, L.; Mrabet, R.; Duponnois, R.; Hafidi, M. 2019. Phosphate solubilizing and PGR activities of ericaceous shrubs microorganisms isolated from Mediterranean forest soil. **Biocatal. Agricul. Biotechnol.** 19. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101128>.

Hankin, L.; Anagnostakis, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycol.** 67. 597-607. <https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019782>.

Harman, G. E.; Uphoff, N. 2019. Symbiotic root-endophytic soil microbes improve crop productivity and provide environmental benefits. **Scientifica.** 1-25. <https://doi.org/10.1155/2019/9106395>.

Hassan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Tech.** 39. 235-251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>.

Hassani, M. A.; Durán, P.; Hacquard, S. 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome.** v. 58. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>.

Hernández-León, R.; Rojas-Solís, D.; Contreras-Pérez, M.; Orozco-Mosqueda, M. del C.; Macías-Rodríguez, L. I.; Cruz, H. R. de la; Valencia-Cantero, E.; Santoyo, G. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produce by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biol. Control.** 81. 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>.



- Hernández-Rodríguez, A.; Heydrich-Pérez, M.; Acebo-Guerrero, Y.; Velazquez-Del Valle, M. G.; Hernandez-Lauzardo, A. N. 2008. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). **Appl. Soil Ecol.** 39. 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.008>.
- Heydari, S.; Moghadam, P. R.; Kennedy Arab, S. M. 2008. Hydrogen cyanide production ability by *Pseudomonas fluorescence* bacteria and their inhibition potential on weed germination. In Proceedings: **Competition for resources in a changing world: new drive for rural development**. Tropentag. Hohenheim.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. 1938. **The water-culture method for growing plants without soil**. Circ. nº 347. California Agricultural Experimental Station.
- Hungria, M.; Campo, R. J.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, 331. 413-425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>
- Ikeda, A. C.; Bassani, L. L.; Adamoski, D.; Stringari, D.; Cordeiro, V. K.; Glienke, C.; Steffens, M. B. R.; Hungria, M.; Galli-Terasawa, L. V. 2013. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microb. Ecol.** 65, 154-160. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0104-0>.
- Ikeda, A. C.; Zecchin, V. J. S.; Savi, D. C.; Kava, V.; Glienke, C.; Hungria, M.; Galli-Terasawa, L. V. 2018. Bio prospecting plant growth-promoting bacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. **J. Biothech. Res. Biochem.** 1:003.
- Judd, A. K.; Scheneider, M.; Sadowsky, M. J.; Bruijn, F. J. de. 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 59, 1702-1708. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.6.1702-1708.1993>.
- Karagöz, K.; Ates, F.; Karagöz, H.; Kotan, R.; Cakmake, R. 2012. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. **Eur. J. Soil Biol.** 50. 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.007>.
- Kaschuk, G.; Hungria, M.; Andrade, D. S.; Campo, R. J. 2006. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. **Appl. Soil Ecol.** 32, 210-220. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.06.008>.
- Khan, A. A. H. 2019. Plant-bacterial association and their role as growth promoters and biocontrol agents. **Microorg. Sustaninab.** 13. 389-419. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6986-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6986-5_16).
- Kim, M. J.; Radhakrishnan, R.; Kang, S. M.; You, Y. H.; Jeong, E. J.; Kim, J. G.; Lee, I. J. 2017. Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-25 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. **Physiol. Mol. Biol. Plants.** 23. 571-580. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0449-4>.

Kimono, M.; Soh, S. H. G.; Hirao, I. 2020. Sanger gap sequencing for genetic alphabet expansion of DNA. **ChemBioChem**. .  
<https://doi.org/10.1002/cbic.202000057>.

Kour, D.; Rana, K. L.; Yadav, N.; Yadav, A. N.; Kumar, A.; Meena, V. S.; Singh, B.; Chauhan, V. S.; Dhaliwal, H. S.; Saxena, A. K. 2019. Rhizospheric microbiomes: biodiversity, mechanisms of plant growth promotion, and biotechnological applications for sustainable agriculture. **Plant Growth Promoting Rhizo. Agricul. Sustain.** 19-65. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_2).

Kuan, K. B.; Othman, R.; Abdul Rahim, K.; Shamsuddin, Z. H. 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PLoS One**. 11. 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>.

Kumar, A.; Singh, J. 2020. Biofilms forming microbes: diversity and potential applications in plant-microbe interaction and plant growth. In: Yadav, A.; Singh, J.; Rastegari, A.; Yadav, N. (eds). *Plants Microbiomes Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity*. 25. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1_6)

Kumar, S.; Singh R.; Williams, C. P.; Van Der Klei, I. J. 2016. Stress exposure results in increased peroxisomal levels of yeast Pnc1 and Gpd1, which are imported via a piggy-backing mechanism. **Biochim. Biophys. Acta**. 148-156.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.017>.

Kumar, V.; Kumar, A.; Pandey, K. D.; Roy, B. K. 2015. Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora*. **L. Ann. Microbiol.** 65. 1391-1399. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0977-x>.

Kumar, V. S.; Menon S.; Agarwal, H.; Gopalakrishnan, D. 2017. Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. **Resour. Effic. Technol.** 3. 434-439.  
<https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.04.004>.

Li, Q.; Wu, Y. W.; Chen, W.; Jin, R.; Kong, F. L.; Ke, Y. P.; Shi, H. C.; Yuan, J. C. 2017. Cultivar differences in root nitrogen uptake ability of maize hybrids. **J. Exp. Bot.** 62, 1490-1509. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01060>.

Lobo, C. B.; Tomás, M. S. J.; Viruel, E.; Ferrero, M. A.; Lucca, M. E. 2019. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiol. Res.** 219, 12-25.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>.

Maela, P. M.; Serepa-Dlamini, M. H. 2019. Current understanding of bacterial endophytes, their diversity, colonization and their roles in promoting plant growth. **Appl. Microbiol.** 5, 1-12. <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000157>.

Malusà, E.; Pinzari, F. Canfora L. 2016. Efficacy of biofertilizers: challenges to improve crop production. **Microbial. Inocul. Sustain. Agricul. Produc.** 2, 17-40. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_2).

Marques, A. S. A.; Marchaisson, A.; Gardan, L.; Samson, R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* – *P. viridiflava* group. **Genet. Mol. Biol.** 31. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000100019>.

Mayer, E.; Quadros, P. D. de; Fulthorpe, R. 2019. *Plantibacter flavus*, *Curtobacterium herbarum*, *Paenibacillus taichungensis*, and *Rhizobium selenitireducens* endophytes provide host-specific growth promoting of *Arabidopsis thaliana*, Basil, lettuce, and bok choy plants. **Appl. Environ. Microbiol.** <https://doi.org/10.1128/AEM.00383-19>.

Menna, P.; Hungria, M.; Barcellos, F. G.; Bangel, E. V.; Hess, P. N.; Martinez-Romero, E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Syst. Appl. Microbiol.** 29, 315-332. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.002>.

Meyer, J. B.; Frapolli, M.; Keel, C.; Maurhofer, M. 2011. Pyrroloquinoline Quinone Biosynthesis Gene *pqqC*, a Novel Molecular Marker for Studying the Phylogeny and Diversity of Phosphate-Solubilizing *Pseudomonads*. **Appl. Environ. Microbiol.** 77(20), 7345-7354. <https://doi.org/10.1128/AEM.05434-11>.

Mouayed, H.; Wardy, G. A.; Seddeq, A. S. S. 2019. Isolation and identification of *Pseudomonas putida* from soils of plant roots and determine the ability to produce hydrolases enzymes. **Iraqi J. Sci.** 60. 228-233. <https://doi.org/10.24996/ij.s.2019.60.2.4>

Mostasso, L.; Mostasso, F. L.; Vargas, M. A. T.; Hungria, M. 2002. Selected of bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia strains for the Brazilian Cerrados. **Field. Crops. Res.** 73, 121-132. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00186-1).

Mumtaz, M. Z.; Ahmad, M.; Jamil, M.; Hussain, T. 2017. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. Potential candidates for biofortification in maize. **Microbiol. Res.** 202. 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.001>.

Nautiyal, C. S.; Srivastava, S.; Chauhan, P. S.; Seem, K.; Mishra, A.; Sopory, S. K. 2013. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. **Plant. Physiol. Biochem.** 66. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.020>.

Nehl, D. B.; Allem, S. J.; Brown, J. F. 1997. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Appl. Soil Ecol.** 5. 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00124-2).

Oksanen, J.; Blamchet, F. G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P. R.; O'Hara, R. B.; Simpson, G. L.; Solymos, P.; Stevens, M. H. H.; Szoecs, E.; Wagner, H. 2019. vegan: Community ecology package. **R package**

**version 2.5-6. URL:**

<https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>

Padda, K. P.; Puri, A.; Zeng, Q.; Chanway, C. P.; Wu, X. 2017. Effects of GFP-tagging on nitrogen fixation and plant growth promoting of an endophytic diazotrophic strain of *Paenibacillus polymyxa*. **Botany**. 95. 933-942. <https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0056>.

Pan, Q.; Shikano, I.; Hoover, K.; Liu, T-X.; Felton, G. W. 2019. *Enterobacter ludwigii*, isolated from the gut microbiota of *Helicoverpa zea*, promotes tomato plant growth and yield without compromising anti-herbivore defenses. **Arth.-Plant. Int.** 13. 271-278. <https://doi.org/10.1007/s11829-018-9634-9>.

Parte, A. C. 2013. LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Res.** 42, 613-616. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1111>.

Parte, A. C. 2018. LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 68, 1825-1829. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>.

Park, M.; Kim, C.; Yang, J.; Lee, H.; Shin, W.; Kim, S.; Sa, T. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiol. Res.** 160. 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.003>.

Patten, C. L.; Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indol acetic acid in development of the host plant root system. **Appl. Environ. Microbiol.** 68, 3795-3801. <https://doi.org/10.1128/aem.68.8.3795-3801.2002>.

Pii, Y.; Aldrighetti, A.; Valentinuzzi, F.; Mimmo, T.; Cesco, S. 2019. *Azospirillum besilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **J. Exp. Bot.** 70. 1313-1324. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery433>.

Prabhu, N.; Borkar, S.; Garg, S. 2019. Phosphate solubilization by microorganisms: Overview, mechanisms, applications and advances. **Adv. Biol. Sci. Res.** 161-176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>.

Pradhan, A. K.; Pradhan, N.; Sukla, L. B.; Panda, P. K.; Mishra, B. K. 2014. Inhibition of pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by *Lysinibacillus fusiformis* S9. **Bioprocess. Biosyst. Eng.** 37. 139-149. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0976-5>.

Quiroga, G.; Erice, G.; Aroca, R.; Zamarreño, Á. M.; García-Mina, J. M.; Ruiz-Lozano, M. 2020. Radial water transport in arbuscular mycorrhizal maize plants under drought stress conditions is affected by indole-acetic acid (IAA) application. **J. Plant Physiol.** 246-247. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153115>.

Radha, T. K.; Rao, D. L. N. 2014. Plant growth promoting bacteria from cow dung based biodynamic preparations. **Ind. J. Microbiol.** 54. 413-418. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0468-6>.

Rahma, H.; Nurbailis; Kristina, N. 2019. Characterization and potential of plant growth-promoting rhizobacteria on rice seedling growth and the effect on *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Biodiversitas**. 20. 3654-3661. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201226>.

Ramos, P. L., Moreira-Filho, C. A., Trappen, S. V., Swings, J., Vos, P. D., Barbosa, H. R., Thompson, C. C., Vasconcelos, A. T. R., Thompson, F. L. 2011. Na MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 106. 394-399. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400003>.

Reetha, S.; Bhuvaneswari, G.; Thamizhiniyan, P.; Mycin, T. R. 2014. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allim cepa* L.). **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**. 3. 568-574.

Renwick, A.; Campbell, R.; Coe, S. 1991. Assesment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathol**. 40. 524-532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02415.x>.

Ribeiro, C. M.; Cardoso, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiol. Res**. 167. 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.03.003>.

Rojas-Solís, D.; Zetter-Salmón, E.; Contreras-Pérez, M.; Rocha-Granados, M. del C.; Macías-Rodríguez, L.; Santoyo, G. 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promotiong effects. **Biocatal. Agricul. Biotechnol**. 13, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.007>.

Ronquist, F.; Teslenko, M.; Van Der Mark, P.; Ayres, D. L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M. A.; Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst. Biol**. 61. 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.

Ryan, R. P.; Monchy, S.; Cardinale, M.; Taghavi, S.; Crossman, L.; Avison, M. B.; Berg, G.; Van der Lelie, D.; Dow, J. M. 2009. The versality and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nat. Rev**. 7. 514-525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>.

Sansinenea, E. 2019. *Bacillus* spp.: As plant growth-promoting bacteria. **Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms**. 225-237. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_11)

Sarkar, A.; Ghosh, P. K.; Pramanik, K.; Mitra, S.; Soren, T.; Pandey, S.; Mondal, M. H.; Maiti, T. K. 2018. A halotolerant *Enterobacter* sp. Displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. **Res. Microbiol**. 169, 20-32. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>.



- Satyaprakash, M.; Nikitha, T.; Reddi, E. U. B., Sadhana, B., Vani, S. S. 2017. Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 6. 2133-2144. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>.
- Sebestová, A.; Baron, D.; Pechancová, R.; Pluháček, T.; Petr, j. 2019. Determination of oxaliplatin enantiomers at attomolar levels by capillary eletrophoresis connected with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta.** 205. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120151>.
- Shabanamol, S.; Divya, K.; George, T. K.; Rishad, K. S.; Sreekumar, T. S.; Jisha, M. S. 2018. Characterization and *in planta* nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*). **Physiol. Mol. Plant. Path.** 102. 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.11.003>.
- Shah, S. B.; Hu, H.; Wang, W.; Liu, Y.; Ali, F.; Xu, P.; Tang, H. 2019. Evaluation of plant growth-promoting activity of strain HBCD-sjtu. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents.** 33. 1187-1192.
- Sierra, G. A. 1957. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. **Antonine van Leeuwenhoeck.** 28. 15-22. <https://doi.org/10.1007/bf02545855>.
- Singh, R. K.; Kumar, D. P.; Solanki, M. K.; Singh, P.; Srivastva, A. K.; Kumar, S.; Kashyap, P. L.; Saxena, A. K.; Singhal, P. K.; Arora, D. K. 2013. Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* BCM18. **J. Basic. Microbial.** 53. 451-460. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100590>.
- Sneath, P. H. A.; Sokal, R. R. 1973. **Numerical taxonomy.** Freeman, San Francisco. 573 pp.
- Souza, P. M. de; Magalhães, P. de O. e. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amilase in industry – A review. **Braz. J. Microbiol.** 41. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004> .
- Su, W.; Kamran, M.; Xie, J.; Meng, X.; Han, Q.; Liu, T.; Han, J. 2019. Shoot and root traits of summer maize hybrid varieties with higher grain yields and higher nitrogen use efficiency at low nitrogen application rates. **Peer J.** 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.7294>.
- Suzuki, R.; Shimodaira, H. 2006. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics.** 22. 1540-1542. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117>.
- Szilagyi-Zecchin, V. J.; Ikeda, A. C.; Hungria, M.; Adamoski, D.; Kava-Cordeiro, V.; Glienke, C.; Galli-Terasawa, L. V. 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express.** v. 26. p. 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0026-y>.

Tang, A.; Haruna, A. O.; Majid, N. M. A.; Jalloh, M. B. 2020. Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms*. 8. 442. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030442>.

Tank, N.; Rajendran, N.; Patel, B.; Saraf, M. Evaluation and biochemical characterization of a distinctive pyoverdine from a *Pseudomonas* isolated from chickpea rhizosphere. **Braz. J. Microbiol.** 43. 639-648. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200028>.

Tiwari, S.; Prasad, V.; Chauhan, P. S.; Lata, C. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulate plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. **Front. Plant. Sci.** 8. 1510. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01510>.

Torok, I.; Kondorosi, A. 1981. Nucleotide sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene. **Nucleic Acids Research**. 9. 5711-5723. <https://doi.org/10.1093/nar/9.21.5711>.

Viana, T. F. C.; Campelo, A. P. S.; Baldani, J. I.; Fernandes Júnior, P. I.; Baldani, V. L. D.; Silva, W. M.; Paggi, G. M.; Brasil, M. S. 2020. Cultivable bacterial diversity associated with bromeliad roots from ironstone outcrops in central Brazil. **Braz. J. Biol.** <https://doi.org/10.1590/1519-6984.224982>.

Videira, S. S.; Oliveira, D. M.; Morais, R. F.; Borges, W. L.; Baldani, V. L. D.; Baldani, J. I. 2012. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**. 356, 51-66. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1082-6>.

Zang, G.; Sun, Y.; Sheng, H.; Li, H.; Liu, X. 2018. Effects of the inoculation using bacteria producing ACC desaminase on ethylene metabolism and growth of wheat grown under different soil water contents. **Plant. Physiol. Biochem.** 125. 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.005>.

Zuluaga, M. Y. A.; Milani, K. M. L.; Gonçalves, L. S. A.; Oliveira, A. L. M. de. 2020. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of *Solanum*. **PLoS One**. p. 1-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227422>.

Yanni, Y. G.; Dazzo, F. B. 2010. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant Soil**. 336, 129-142. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0454-7>.

Yanni, Y. G.; Rizk, R. Y.; Corich, V.; Squartini, A.; Ninke, K.; Philip-Hollingsworth, S.; Orgambide, G.; Bruijn, F. D.; Stolfus, R.; Buckley, D.; Schmidt, T.; Mateos, P. F.; Ladha, J. K.; Dazzo, F. B. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant Soil**. 194. 99-114. <https://doi.org/10.1023/A:1004269902246>.

Yu, G.; Lam, T. T. L.; Zhun, H.; Guan, Y. 2018. Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using ggtree. **Mol. Biol. Evol.** 35. 3041-3043. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy194>.

Yu, G.; Smith, D. K.; Zhu, H.; Guan, Y.; Lam, T. T. Y. 2017. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. **Methods Ecol. Evol.** 8. 28-36. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>.

Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. 1991. **J. Bacteriol.** 173, 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sequenciamento revelou a presença dos gêneros *Atlantibacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas*. Onze isolados obtiveram destaque em experimento *in vivo*, e destes os seis isolados LGMB12, LGMB273, LGMB319, LGMB426, LGMB444 (*Bacillus* sp.) e LGMB429 (*Paenibacillus* sp.), que não apresentam espécies patogênicas aos humanos em seus gêneros, são os que apresentaram maior potencial bioquímico para promover crescimento vegetal em plantas de milho.

Esse trabalho identificou e descreveu bactérias com habilidades específicas de novos inoculantes para o milho, como o aumento do sistema radicular das plantas, produção de sideróforo, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção de ácido indol acético, assim como a capacidade de produção das enzimas amilase, celulase, pectinase, quitinase, urease, esterase e protease, de promoverem ações indiretos na promoção de crescimento. As seis bactérias identificadas visam, de alguma forma, impactar na produção e consequentemente levar a alternativas sustentáveis, as quais levam a diminuição do uso de insumos químicos, que acarretam significativo impacto ambiental.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**. v. 27. p. 617 – 631. 2008.
- AHMED, N.; SHAHAB, S. Phosphate solubilization: their mechanism genetics and application. **International Journal of Microbiology**, v. 9, p. 4408 – 4412. 2011.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da biologia moderna**: Volume Único. 4ª Ed. Editora Moderna: São Paulo. 839 p. 2006.
- ANTUNES, J. M. **Inoculantes para milho é lançado no Rio Grande do Sul**. 2019. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br>>. Acesso em: 13 mar 2020.
- ARAÚJO, S. C. do. Curso Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). **EAD ANPII**. 2018. Disponível em: <<http://www.anpii.eadplataforma.com>>. Acesso em: 08 set 2018.
- AZEVEDO, J. L., Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**. p. 117 – 137. 1998.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, n.5/6, v.29, p. 911 - 922. 1997.
- BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Leipzig: Engelamn. p. 316. 1866.
- BATISTA, B. D. **Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2017.
- BERG, G.; EGAMBERDIEVA, D.; LUGTENBERG, B.; HAGEMANN, M. Symbiotic Plant – Microbe Interactions: Stress Protection, Plant Growth Promotion, and Biocontrol by Stenotrophomonas. **Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**, v.18, p. 445 – 460. 2010.
- BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; MIRZA, M. S.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiology Ecology**. v., Issue 3, 1. p. 455 – 470. 2006.
- BOBATO, A. **Índice nutricional do nitrogênio: uma ferramenta para o diagnóstico do estado nutricional da cultura do milho**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v.42, p. 241 - 250. 1995.

BOURSCHEIDT, M. L. B.; PEDREIRA, B. C.; PEREIRA, D. H.; ZANETTE, M. C.; DEVENS, J. Estratégias de fornecimento de nitrogênio em pastagens: fertilizante mineral, inoculante bacteriano e consórcio com amendoim forrageiro. **Embrapa Agrossilvipastoril – Artigo em periódico indexado (ALICE)**. 2019.

BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crop Research**. Amsterdam, v. 11, p. 131 – 139. 1985.

BRASIL. Decreto de Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980. **Diário Oficial da União da Coleção de Leis do Brasil**. Brasília. v. 7. p. 228. 1980.

BRAKER, G.; ZHOU, J.; WU, L.; DEVOL, A. H.; TIEDJE, J. M. Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers to Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66 (5), p. 2096 – 2104. 2000.

BRUTO, M.; PRIGENT-COMBARET, C.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**. 2014.

BULEGON, L. G.; INAGAKI, A. M.; MORATELLI, G.; COSTA, N. V. da; GUIMARÃES, V. F. Phytotoxicity of mesotriona in corn with *Azospirillum brasilense* associated nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 325 – 331. 2017.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANI-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field Inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**. Rehovot, v. 13, p. 243 – 253. 1992.

CARVALHO, G. A. B.; FERREIRA, E.; HUNGRIA, M. In: Jornada acadêmica da Embrapa Soja. SARAIVA, O. F. (eds) **A importância do controle de qualidade dos inoculantes**. Londrina: Embrapa Soja, p. 64 – 66. 2010.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. f. 149. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2005.

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S. Screening and optimization of indole-acetic-acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. **Current Microbiology**, v.62, p.173-181, 2011.

CHOI, O.; KIM, J.; KIM, J. G.; JEONG, Y.; MOON, J. S.; PARK, C. S.; HWANG, I. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Plant Physiology**, v. 146, p. 657 – 668. 2008.

CHOUDHARY, D. K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N., Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology**. v. 47. p. 289-297. 2007.

COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, G. M. B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.31, n.6, p.1413 - 1420, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Série Histórica das Safras**. 2020. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 05 fev 2020.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v.39, n.6, 2009.

DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v.159, p.371-394, 2004.

DEY, R.; PAL, K. K.; TILAK, K. V. B. B. Future challenges in crop protection against fungal pathogens. **Fungal Biology**. 2014.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, V.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107 – 149. 2010.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: International Symposium on Nitrogen Fixation, 1. Pullman. **Proceedings**. Pullman: WSU Press, p. 518 – 538. 1976.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de Beijerinckia. **Revista de Biologia**, v.1, p.261-272. 1958.

DONATO, V. M. T.; ANDRADE, A. G. de; SOUZA, E. S. de; FRANÇA, J. G. E. de; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana de açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1087 – 1093. 2004.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v. 32, p. 227-243. 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa milho e sorgo**, 2015. Disponível em: <<http://www.spo.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 08 set 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fixação Biológica de Nitrogênio**, 2018. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 08 set 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Inoculante Para Gramíneas**, 2011. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 16 jan 2020.

FERJANI, R.; GHARSA, H.; ESTEPA-PÉREZ, V.; GÓMEZ-SANZ, E.; CHERNI, M.; MAHJOUBI, M.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C.; OUZSARI, H. I. Plant growth-promoting *Rhizopseudomonas*: expanded biotechnological purposes and antimicrobial resistance concern. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 51 – 59. 2019.

FERNANDES, G. C.; SOUZA, J. A. M.; CAMPANHARO, J. C. **Uso da técnica de BOX – PCR na caracterização molecular de isolados rizosféricos de plantas de milho**. 2009. Disponível em: <<http://www.web2.sbg.org.br>>. Acesso em: 13 set 2019.

FERNÁNDEZ, F. D.; GALDEANO, E.; CONCI, L. R. Phytoplasmas diversity and identification of new aster yellows subgroup (16Srl) associated with weed species in Argentina. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 70. 2020.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa/Cenargen. p. 220. 1998.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; ARAUJO, F. F. de. Plant growth-promoting rhizobacteria: key mechanisms of action. In: CHOUDHARY, D. K., VARMA, A. (eds) **Microbial-mediated induced systemic resistance in plants**. Springer, Singapore, p. 23 – 37. 2016.

FONSECA, G. G.; OLIVEIRA, D. P.; SOARES, B. L.; FERREIRA, P. A. A.; TEIXEIRA, C. M.; MARTINS, F. A. D.; MOREIRA, F. M. de S.; ANDRADE, M. J. B. de. Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**. v. 29. p. 1778-1787. 2013.

FREIRE, J. R. J.; RHOR, T. G.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura. p.19-24. 1968.

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 987 – 994. 2004.

GALVÃO, P. G.; URQUIAGA, S.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **EMBRAPA Agroecologia**, Documentos v. 270, p. 63, 2010.

GARBEVA, P.; HOL, W. H. G.; TERMORSHUIZEN, A. J.; KOWALCHUK, G. A.; BOER, W. de. Fungistasis and general soil biostasis – A new synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 43. p. 469 – 477. 2011.

GARCIA DE SALOMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**. Berlin, v. 23, p. 249 – 256. 1996.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**. v. 169, p. 30 – 39. 2014.

GOMI, K.; MATSUOKA, M. Gibberellin signaling pathway. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 6, p. 489 – 493. 2003.

HA, S.; VANKOVA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L. S. P. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. **Trends in Plant Science**. v. 17. p. 172 – 179. 2012.

HANIF, K.; HAMEED, S.; IMRAN, A.; NAQQASH, T.; SHAHID, M.; VAN ELSAS, J. D. Isolation and characterization of a B-propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Frontiers Microbiology**, v. 2, p. 95 – 108. 2015.

HASSANI, M. A.; DURÁN, P.; HACQUARD, S. Microbial interactions within the plant halobiont. **Microbiome**. v. 58. 2018.

HERRERA, J. M.; RUBIO, G.; LEVY, L.; DELGADO, J. A.; LUCHO-CONSTANTINO, C. A.; ISALASVADEZ, S.; PELLET, D. Emerging and established technologies to increase nitrogen use efficiency of cereals. **Agronomy**, Base, v. 6, n. 2, p. 25. 2016.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa**. Documentos 325. ISSN: 1516-781X. jan. 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, p.413-425, 2010.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**. 65, 154-160. 2013.

JAHNES, B. C.; SABREE, Z. L. Nutritional symbiosis and ecology of host-gut microbe systems in the Blattodea. **Current Opinion in Insect Science**. 2020.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45. p. 2761 – 2764. 2007.

JOSHI, K.; CHAVAN, P.; WARUDE, D.; PATWARDHAN, B. Molecular markers in herbal drug technology. **Current Science**. v. 87. p. 159 – 165. 2004.



KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**. Berlin, v. 4, p. 27-35. 1987.

KOGA, J.; ADACHI, T.; HIDAKA, H. IAA Biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-pyruvic acid in *Enterobacter cloacae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 701 – 706. 1991.

KOUR, D.; RANA, K. L.; YADAV, N.; YADAV, A. N.; KUMAR, A.; MEENA, V. S.; SINGH, B.; CHAUHAN, V. S.; DHALIWAL, H. S.; SAXENA, A. K. Rhizospheric microbiomes: biodiversity, mechanisms of plant growth promotion, and biotechnological applications for sustainable agriculture. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability**, p. 19 – 65. 2019.

LIU, Y.; LAI, Q.; GÖKER, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; WANG, M.; SUN, Y.; WANG, L.; SHAO, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**. v. 5. p. 14082. 2015.

LOBO, C. B.; TOMÁS, M. S. J.; VIRUEL, E.; FERRERO, M. A.; LUCCA, M. E. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiological Research**, v. 219, p. 12 – 25. 2019.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. Pernambuco: **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2013. ISSN: 2448-2811.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, London, v. 2. 1995.

MATSUMURA, E. E.; SECCO, V. A.; MOREIRA, R. S.; SANTOS, O. J. P.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, A. L. M. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology**. First published online: p. 1 - 14. 2015.

MEYER, J. B.; FRAPOLLI, M.; KEEL, C.; MAURHOFER, M. Pyrroloquinoline Quinone Biosynthesis Gene *pqqC*, a Novel Molecular Marker for Studying the Phylogeny and Diversity of Phosphate-Solubilizing Pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77(20), p. 7345 - 7354. 2011.

MILLEO, M. V. R.; PEREREIRA, I. C. Avaliação da eficiência agrônômica da inoculação com Azzofix® (*Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6) sobre a cultura do milho. **Scientia Agraria**. v. 17. p. 14 – 23. 2017.

MOREIRA, A. L. de L.; ARAÚJO, F. F. de,. Produção de fosfatases, enzima ACC desaminase e antagonismo a fitopatógenos por rizobactérias. **Colloquium agrariae**, v. 7, p. 94 – 99. 2011.

MOREIRA, F. M. de S.; SILAVA, K da; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MOREIRA, R. C.; VALADÃO, F. de A.; VALADÃO JÚNIOR, D. D. Desempenho agrônômico do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 62. 2019.

NAYAK, B. S.; BADGLEY, B.; HARWOOD, V. Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental *Enterococcus* isolates by BOX-PCR typing and 16S r RNA gene sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77. p. 5050 – 5055. 2011.

NEHL, D. B.; ALLEM, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, n.1, p.1-20, 1997.

O'DONNELL, A. G.; GÖRES, H. E. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 225-229, 1999.

OLIVEIRA, A. L. M. de; CANUTO, E. D. de; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v.284, p.23-32, 2006.

OLIVEIRA, J. A. dos S. de; OLIVEIRA JÚNIOR, V. A. de; CÓTICA, L. F.; CONTE, H.; PAMPHILE, J. A. Síntese biológica de nanopartículas mediada por micro-organismos endofíticos. **Saber Científico**, v. 8, n. 1, p. 146 – 155. 2019.

OLIVEIRA, R. P.; LIMA, S. F.; ALVAREZ, R. de C. F.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, M. P.; BRASIL, M. S. *Azospirillum brasilense* Inoculation and management of Fertilizer nitrogen in maize. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 347 – 361. 2018.

OZEKI, C.; ROSSINE, F.; CAVALCANTE, L.; FRANCIOSI, R. N.; MELHEM, R. S. C.; NARDI, R. Rizosfera rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, p. 16. 2010.

OWEN, D.; WILLIAMS, A. P.; GRIFFITH, G. W.; WITHERS, P. J. A. Use of commercial bioinoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 84, p. 41 – 54. 2015

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.213-222, 2007.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 207–220. 1996.

PEIXOTO, P. H. P. **Propagação das plantas: Princípios e práticas**. UFJF: Departamento de Botânica: Juiz de Fora. 107 p. 2017.



PENG, G.; ZHANG, W.; LUO, H.; XIE, H.; LAI, W.; TAN, Z. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild Rice species *Oryza latifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.1650-1655, 2009.

PENOT, I.; BERGES, N.; GUIGUENÉ, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 38, p. 798 – 803. 1992.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. de O.; CAMPO, R. J.; TORRES, E. Variações Qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1397-1412, 2007.

PEREIRA, G. C.; DIAS, F. M.; SILVA, C. C. P.; JESUS, E. V. de. Alongamento e enraizamento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Nanicão sob influência de diferentes concentrações de ácido indol acético – AIA. In: **Sistema de Eventos IFMG, VII Seminário de Iniciação Científica IFMG**. Sabará. 2018.

PICAZEVICZ, A. A. C.; KUSDRA, J. F.; MORENO, A. de L. Maize growth in response to rhizobacteria, molybdenum and nitrogen. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**. v. 10, p. 167 – 174. 2019.

RAJU, P. N.; EVANS, H. J.; SEIDLER, R. J. An Asymbiotic Nitrogen-Fixing Bacterium from the Root Environment of Corn. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.69, n.11, p.3474-3478. 1972.

RAMAGNOLI, C. L.; PELLEGRINO, K. C. M.; SILVA, N. M.; BRIANESI, U. A.; LEÃO, S. C.; RABELLO, M. C. da S.; VIANA-NIERO, C. Diversity of *Mycobacteriaceae* from aquatic environment at the São Paulo Zoological Park Foundation in Brazil. **PLoS One**. 2020.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 167–177, 2000.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**. v. 21. p. 541 – 554. 2004.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v.6, n.4, p.139-144, 1998.

REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia – Documentos (INFOTECA-E)**. 2007.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and pal trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 227 – 247. 2000.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorous by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 28, p. 897 – 906. 2001.

RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **Plant Cell**. v. 18, p. 40 – 54. 2006.

RIOS, G. S. **Eficiência na assimilação de nitrogênio na forma nítrica (N-NO<sub>3</sub>) em genótipos de arroz de terras altas**. 2019.

ROCHA, I.; MA, Y.; CARVALHO, M. F.; MAGALHÃES, C.; JANOUSKOVÁ, M.; VOSÁTKA, M.; FREITAS, H.; OLIVEIRA, R. S. Seed coating with inocula of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria for nutritional enhancement of maize under different fertilization. **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 65. 2019.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ, E. S. de; PASSAGLIA, L. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.924-927. 2005.

SABINO, D. C. C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.

SANSINENEA, E. *Bacillus* spp.: As plant growth-promoting bacteria. **Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms**, p. 225 – 237. 2019.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. de L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. de; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L. **Hoehnea**, v. 32, p.1-8, 2005.

SCHMIDT, M. A.; SOUZA, E. M.; BAURA, V.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, p. 182-185. 2011.

SELIM, K. A.; GHWAS, D. E.; SELIM, R. M.; ABDELWAJAB-HASSAN, M. I. Microbial volatile in defense. In: CHOUDHARY, D. K.; SHARMA, A. K.; AGARWAL, P.; VARMA, A.; TUTEJA, N. (eds) **Volatiles and Food Security**. Springer Singapore, Singapore. p. 135 – 170. 2017.

SILVA, S. M. D.; OLIVEIRA, L. J.; FARIA, F. P.; REIS, E. F. D.; CARNEIRO, M. A. C.; SILVA, S. M. D. Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1931 – 1937. 2011.

SONG, Y.; YANG, L.; WANG, H.; SUN, X.; BAI, S.; WANG, N.; LIANG, J.; ZHOU, L. The coupling reaction of  $\text{Fe}^{2+}$  bio-oxidation and resulting  $\text{Fe}^{3+}$  hydrolysis drastically improve the formation of iron hydroxysulfate minerals in AMD. **Environmental Technology**. 2019.

SOUZA, G. A. de; CARVALHO, M. R. de O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 43. p. 843 – 849. 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 31, p. 425 – 448. 2007.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P. dos; OLIVEIRA, A. L. M. de; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**. v. 75(1), p. 33-40. Epub. 2016.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**. v. 26. p. 1 – 9. 2014.

TORTOLI, E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. **Clinal Microbiology Reviews**. v. 27. p. 727-752. 2014.

VANÇAN, S. I. da S. **Phytomonas serpens: caracterização da piruvato/indolpiruvato descarboxilase e funcionalidade da auxina produzida**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two Pennisetum purpureum Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**. v. 356, p. 51-66. 2012.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. de F.; ANTUNES JÚNIOR, H.; SILVA, M. S. da; SILVA, D. S. G. da; SILVA, U. O. da. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Embrapa Rondônia. Porto Velho. 2013.

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**. v. 31, n. 2, p. 143 – 154. 2010.

ZHANG, Y.; FERNANDO, W. G.; KIEVIT, T. R. de; BERRY, C.; DAAYF, F.; PAULITZ, T. C. Detection of antibiotic-related genes from bacterial biocontrol agents with polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 476 – 481. 2006.

WANI, S. P.; CHANDRAPALAIH, S.; SART, P. J., Responses of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen0fixing bacteria. **Experimental Agriculture**. Trinidad, v. 21, p. 175 – 182, 1985.

WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Bactérias Diazotróficas em mudas de Bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.11, p.2277-2285. 2000.

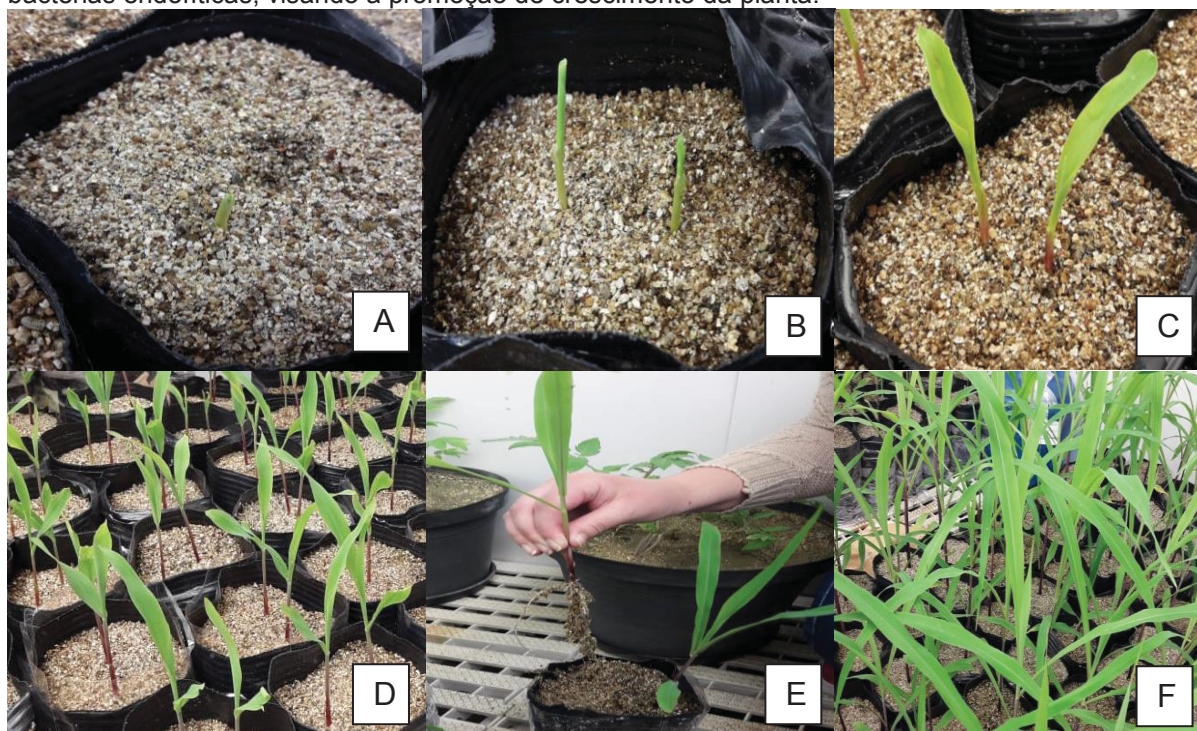
## APÊNDICE 1 – MATERIAL E METÓDOS DETALHADOS

### Preparação do material biológico para experimento em câmara climática de plantas

As bactérias foram repicadas em 5 mL de meio Luria Bertani (Tryptona 10 g; Extrato de Levedura 5g; NaCl 10 g; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1.000 mL; pH = 7,0) e submetidas a agitação de 200 rpm durante 18 h, a 30 °C. A concentração de células bacterianas na solução foi estimada por espectrofotometria em comprimento de onda de 600 nm e ajustada para 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>.

As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 3% por 3 min e lavadas seis vezes em água destilada antes de serem inoculadas em vasos. Os vasos, modelo de produção de mudas, de 1,7 litros, preenchidos com o substrato vermiculita, foram todos autoclavados. O fitotron utilizado pertence ao laboratório LEMID (Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas, do Departamento de Fitopatologia da UFPR).

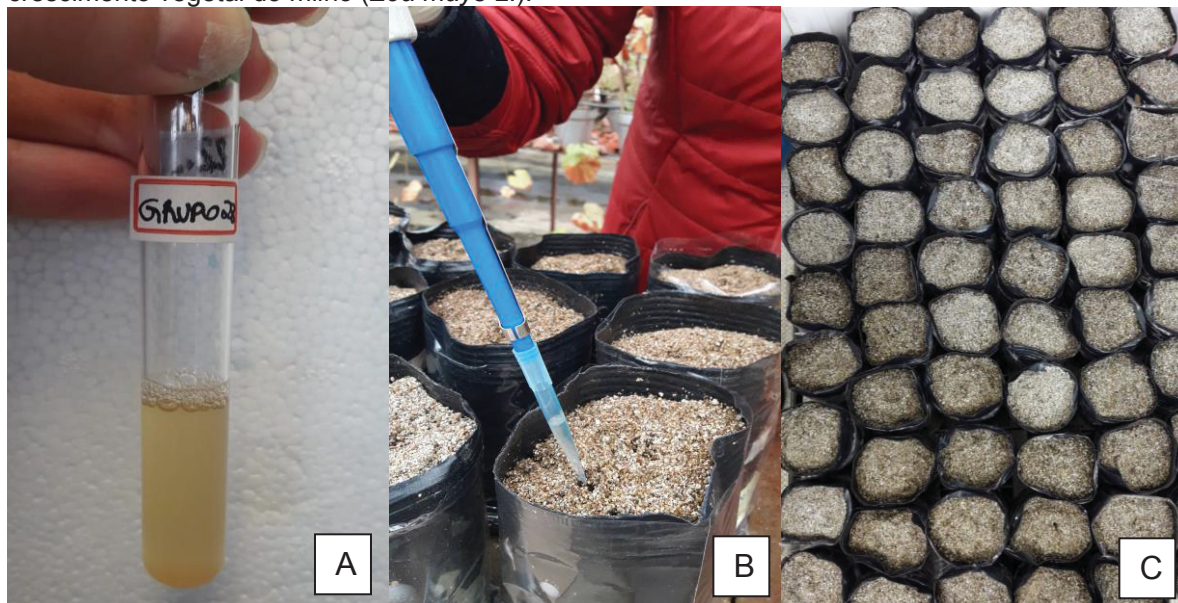
Figura 1 – Avaliação do desenvolvimento do milho, cultivar AG 8087, sob teste de inoculação com bactérias endofíticas, visando a promoção de crescimento da planta.



A) Germinação da semente de milho; B) Plantas com 4 dias após a semeadura; C) Plantas com 5 dias após a semeadura; D) Plantas com 7 dias após a semeadura; E) Plantas com 10 dias após a germinação, realização do processo de desbaste; e F) Plantas com 21 dias após a semeadura.  
Fonte: A Autora (2019).



Figura 2 - Processo de inoculação e montagem do experimento de possíveis bactérias promotoras de crescimento vegetal do milho (*Zea mays* L.).



A) Crescimento bacteriano; B) Inoculação das bactérias em sementes de milho híbrido (AG 8780); e C) Delineamento casualizado dos vasos em câmara climática de plantas.

Fonte: A Autora (2019).

### **Solução Nutritiva do Experimento em câmara climática de plantas**

Os vasos continham substrato vermiculita e eram regados diariamente, intercalados em água destilada estéril e solução nutritiva estéril para plantas (para 1 litro de solução final foi adicionado: 1mL de solução estoque de Fosfato de Potássio monobásico:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  136,1 g; 1 mL de solução estoque de Fosfato de Potássio dibásico:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  136,1 g; 2 mL de solução estoque de Sulfato de Magnésio heptahidratado:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  246,4 g; 5 mL da solução estoque de Nitrato de potássio:  $\text{KNO}_3$  101,10 g; 1 mL da solução estoque de Ferro: EDTA férrico 5,12 g; 1 mL da solução estoque de Micronutrientes: Molibdato de Sódio dihidratado:  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,0 g; Sulfato de Manganês hidratado:  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,18 g; Ácido Bórico:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1,4 g; Sulfato de Cobre pentahidratado:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,04 g; Sulfato de Zinco heptahidratado:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,12 g; Sulfato de Cálcio dihidratado: 0,172 g de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  por litro da solução final e  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1000 mL e pH 6,5-7,0) (HOAGLAND; ARNON, 1938).

## CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO

### **Mecanismos diretos por aumento da disponibilidade de nutrientes**

#### Produção de Sideróforo

Os sideróforos produzidos por bactérias são ligantes fortes que sequestram e complexam o ferro, detectados pela mudança de cor na análise de cromoazurol S (CAS). Os testes bioquímicos descritos por Schwyn e Neilands (1987), para detecção de sideróforos, primeiramente consistiu em preparar uma solução CAS (60,5 mg de CAS em 50 mL de água destilada, misturados a 10 mL de ferro (III)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM em HCl 10 mM) estéril, misturada sob vagarosa agitação a uma solução estéril contendo 72,9 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylamonium) dissolvidos em 40 mL de água destilada.

Em meio sólido DYGS (Dextrose 2 g; Peptona 1,5 g; Extrato de levedura 2 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4$  0,5 g; Ácido L-glutâmico 1,5 g; Ágar 15 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 7,0) deficiente de ferro foi adicionada a solução CAS, onde foram inoculados aleatoriamente cinco isolados bacterianos por placa de Petri e incubados a 32 °C. O crescimento de colônias foi observado durante cinco dias e a mudança de cor do meio de azul para amarelo indicou resultado positivo para produção de sideróforos (CATELLAN, 1999).

#### Solubilização de Fosfato

O teste de solubilização de fosfato foi realizado com adaptações do protocolo de Chagas Junior et al. (2010) com meio de cultura GL (Glicose 10 g; Extrato de Levedura 2 g; Ágar 15 g com adição de uma solução 0,25 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e outra 1 g/L de  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 6,5) onde foram incubados aleatoriamente cinco isolados bactérias por placa de Petri, em triplicata. As placas foram incubadas a 32 °C, com observação de crescimento de colônias durante quatorze dias e o resultado positivo foi observado pela formação de halo translúcido ao redor da colônia.

## Fixação Biológica de Nitrogênio

O teste de fixação biológica de nitrogênio adaptado de Araújo et al. (2004) detectou o potencial de fixação assimbiótica de nitrogênio, com crescimento dos isolados em meio semi-sólido JNFB (Ácido málico 5 g;  $K_2HPO_4$  0,6 g;  $KH_2PO_4$  1,8 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g; NaCl 0,1 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,02 g; Extrato de levedura 20 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,08 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  2,4 mg;  $H_3BO_3$  2,8 mg;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  2 mg;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  2,35 mg;  $Na_2EDTA$  65,6 mg; Biotina 0,1 mg; Piridoxina 0,2 mg; KOH 4,5 g; Azul de bromotimol 0,5% 2 mL; Ágar 2,2 g; pH 6,8). Os isolados foram inoculados em frascos contendo 20 mL do meio de cultura, deixados em temperatura de 32 °C sob agitação de 120 rpm e após sete dias de incubação, foram repicados cinco isolados por placa de Petri com auxílio de alça de platina em meio sólido JNFB suplementado com 20 mg/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar.

As placas foram novamente incubadas em estufa a 32 °C durante sete dias. Os isolados crescidos em meio sólido foram re-inoculados em meio JNFB semi-sólido sem nitrogênio e os isolados que apresentaram formação de película foram considerados prováveis fixadores de nitrogênio biológico. Assim como Ikeda (2014) as re-inoculações sucessiva dos isolados evitou que o crescimento dos isolados e a formação de película fossem devido às reservas de nitrogênio das células bacterianas acumuladas no meio de estoque.

## Mecanismo direto por produção de fitormônio

### Produção de Ácido Indol Acético

A produção de ácido indol acético (AIA) foi realizada segundo Kuss et al. (2007), com adaptação do meio de cultura para King B (Glicerol 7,5 g; Peptona 10 g;  $K_2HPO_4$  0,575 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,75 g; Triptofano 0,25 g;  $H_2O$  destilada q.s.p. 500 mL; pH = 6,8) (KING; WARD; RANEY, 1954). Os isolados foram inoculados em tubos contendo 4 mL de meio de cultura líquido King B com incubação sob agitação de 120 rpm a 32 °C durante 48 h. Após o período de incubação cada amostra foi inoculada em três microtubos, sendo uma apenas com meio King B. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo ao qual foi adicionado o mesmo volume de Reagente de



Salkowski ( $\text{FeCl}_3$  2,4 g;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  84,2 mL;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 200 mL) (SARWAR; KREMER, 1995). E deixados durante 30 minutos no escuro para reagir com o sobrenadante. Após esse período, a intensidade de coloração foi avaliada por espectrofotometria em comprimento de onda de 520 nm. Os valores de absorbância obtidos foram multiplicados pelo peso molecular da auxina comercial ( $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2 = 175,19$ ) e os valores finais expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os dados foram transformados por *raiz de x + 1/2* e as análises estatísticas foram realizadas ANOVA com teste de Tukey a 5% de significância.

### **Mecanismos indiretos por produção de enzimas**

#### **Produção de Amilase**

Também foi realizada a caracterização do perfil enzimático de cada isolado, para isso foi quantificada a produção da enzima a amilase seguindo com adaptações a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), foram repicados aleatoriamente cinco isolados bacterianos por placa de Petri em meio de cultura sólido MM9 (Solução de sais 200 mL ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  64 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 g;  $\text{NaCl}$  2,5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL);  $\text{MgSO}_4$  1M 2 mL; Glicose 10 g;  $\text{CaCl}_2$  1M 0,1 mL; Ágar 15 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 7,0) contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel. Após o crescimento das colônias, foram adicionados a cada placa 10 mL de solução de iodo (3 g de KI em 10 mL de água destilada, com adição de 1 g de cristais de iodo e  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 100 mL) seguido de lavagem imediata com água destilada, conforme presença de halo incolor ao redor da colônia indicou resultado positivo para produção de amilase.

#### **Produção de Celulose**

Para detecção da produção de celulase foi utilizado o método adaptado de Renwick, Campbell e Coe (1991), por reação colorimétrica com solução do corante Vermelho de Congo em meio Mineral ( $\text{CaCO}_3$  0,02 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g; KCl 1,71 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  4,11 g; Ágar 15 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL; 0,5% de carboximetilcelulose; pH 5,0). As placas de Petri contendo o meio de cultura sólido foram repicadas aleatoriamente cinco colônias de bactérias. O

teste foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 32 °C com observação de crescimento bacteriano durante sete dias. Após esse período de incubação, em temperatura ambiente, a cada placa foi adicionada a solução de Vermelho Congo 1% até a cobertura total do meio durante 15 minutos. Após esse período as placas foram lavadas com água destilada e o resultado positivo foi identificado pelo aparecimento de halos claros ao redor das colônias.

### Produção de Pectinase

A detecção de produção de pectinase foi realizada em meio de cultura MM9 (o mesmo que foi utilizado no teste de amilase) contendo 1% de pectina. Em placa de Petri foram repicadas aleatoriamente cinco colônias de bactérias. O teste será realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 32 °C com crescimento bacteriano observado durante sete dias. Após esse período de incubação, em temperatura ambiente, a cada placa foram adicionados 10 mL de lugol seguido de lavagem com água destilada. A presença de halo incolor ao redor da colônia indicou resultado positivo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

### Produção de Quitinase

Para detecção de quitinase, a fonte de carbono do meio MM9 (o mesmo que será utilizado no teste de amilase e pectinase) utilizou 0,08% de quitina coloidal. Produzida a partir da carapaça de siri (MOURA et al., 2005) com as seguintes adaptações: utilizados 50 g de carapaça de siri limpas e moídas até atingirem aspecto pulverizado; desmineralização das carapaças com adição da solução de HCl 7% durante 14 h na proporção de 4:1 da solução ácida/carapaça, seguida de sucessivas lavagens com água destilada e secagem em estufa a 120 °C até peso constante; desproteínização pela adição de solução de NaOH 5% durante 2 h em agitador a 60 rpm, seguida de sucessivas lavagens com água destilada e secagem em estufa a 120 °C até atingir peso constante; desodorização com adição do reagente NaClO 0,36% durante 3 h sob agitação a 60 rpm, seguida de sucessivas lavagens com água destilada e secagem em estufa até peso constante.

As colônias foram repicadas da mesma forma que foi no teste de produção de celulase e o crescimento bacteriano observado até 10 dias de incubação. Os

resultados positivos foram detectados pela formação de halo claro ao redor da colônia (RENEWICK; CAMPBELL; COE, 1991, com adaptações).

### Produção de Urease

O meio de cultura urease ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g; NaCl 10%, 10 mL; Extrato de levedura, 1 g; Azul de bromotimol 0,5%, 2,5 mL;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 800 mL; pH 5,8) foi distribuído em tubos de ensaio mantidos na posição vertical para esterilização por autoclavagem. Para o preparo da solução, foram misturados 20 g de ureia em 180 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$ . Em condições assépticas, foi adicionado 1 mL da solução para cada tubo com 4 mL de meio. No meio de cultura sólido, originalmente verde contido em tubos de ensaio inclinados, foi semeada uma alçada de bactéria e os tubos incubados durante cinco dias a 32 °C. A mudança da cor do meio para azul indicou resultado positivo devido à alcalinização do meio proporcionado pela produção de urease por meio da degradação da amônia (DYE, 1968, com adaptações).

### Deteção de Atividade Esterásica

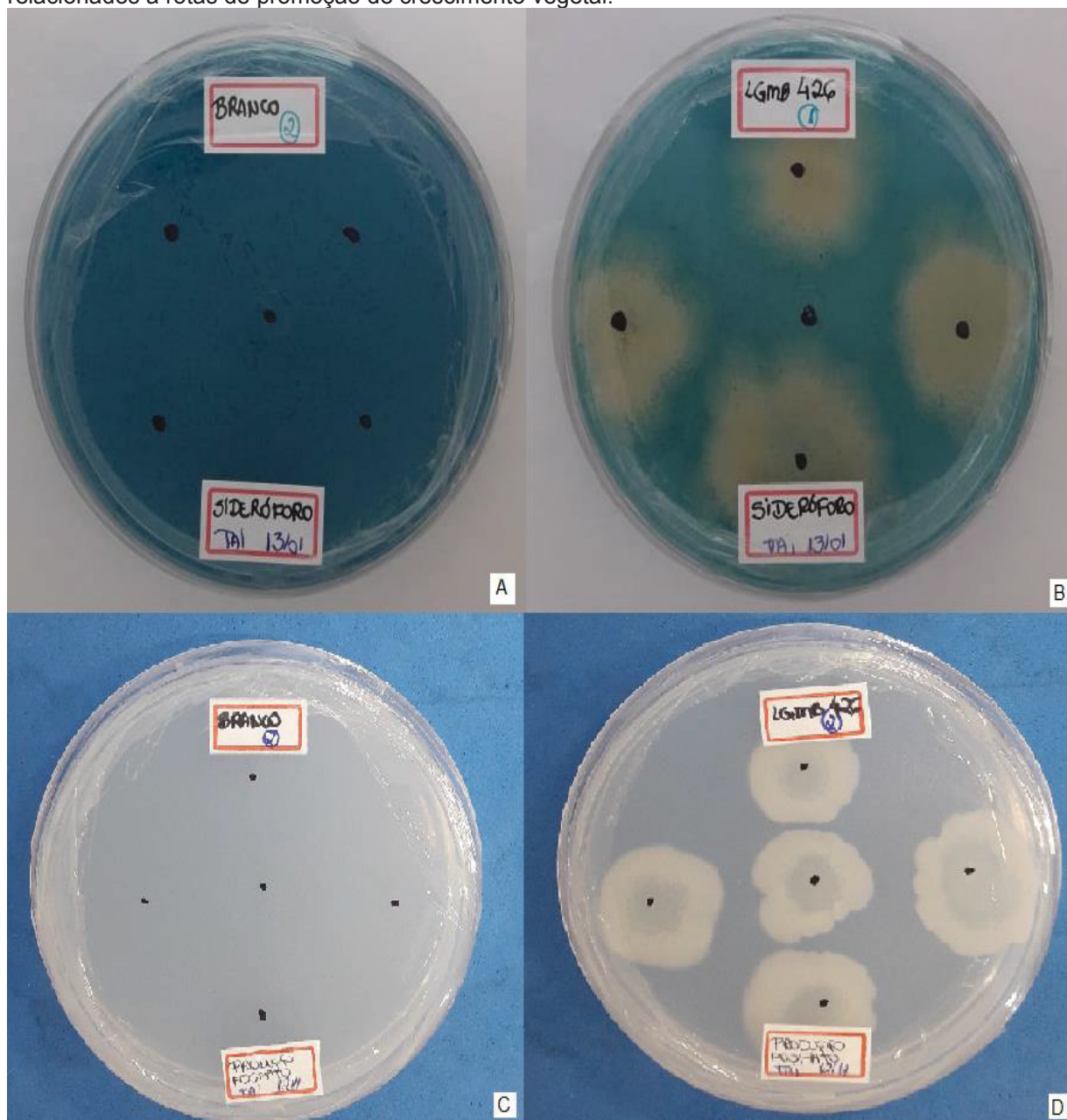
Para detecção de atividade esterásica ou lipásica, foram repicados aleatoriamente cinco isolados bacterianos por placa de Petri em meio de cultura sólido lipase/esterase (Peptona 10 g; NaCl 5 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 g; Ágar 15 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 990 mL; pH 7,4) acrescido de 1% de Tween 80 previamente esterilizado. O teste foi realizado em triplicata com incubação a 32 °C e crescimento bacteriano observado durante 10 dias. A presença de halos ao redor das colônias, formados por cristais, revelaram resultado positivo para a produção de esterases (SIERRA, 1957, com adaptações).

### Deteção de Atividade Proteolítica

Para o teste de atividade proteolítica por degradação de caseína, os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo meio Leite-desnatado-ágar (leite desnatado q.s.p. 1.000 mL aquecido a 55 °C; Trypticase-Soja-Agar 6 g;

Ágar 20 g; pH 7,0) e a atividade de protease foi determinada por formação de halos ao redor das colônias após cinco dias de incubação a 32 °C (BERG et al., 2002, com adaptações).

Figura 3 - Testes *in vitro* de produção de sideróforo e solubilização de fosfato do isolado LGMB426, relacionados a rotas de promoção de crescimento vegetal.

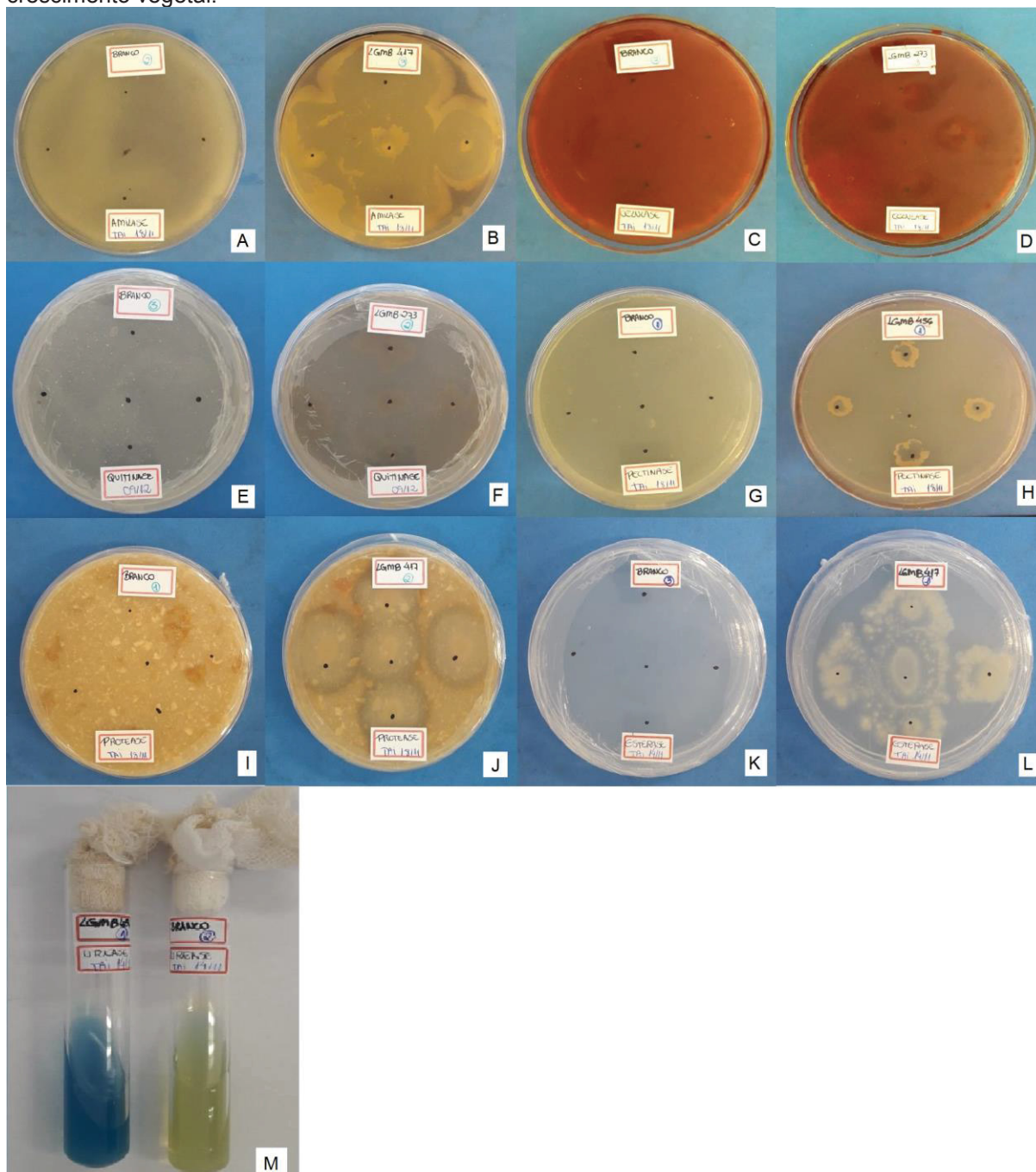


A) Teste em branco para a produção de sideróforo; B) Teste do isolado LGMB426 para a produção de sideróforo, com resultado positivo; C) Teste em branco para a solubilização de fosfato; D) Teste do isolado LGMB426 para a solubilização de fosfato, com resultado positivo;

Fonte: A Autora (2019).



Figura 4 - Testes *in vitro* de caracterização do perfil enzimático, relacionados a rotas de promoção de crescimento vegetal.



A) Teste em branco para a produção de amilase; B) Teste do isolado LGMB417 para a produção de amilase, com resultado positivo; C) Teste em branco para a produção de celulase; D) Teste do isolado LGMB273 para a produção de celulase, com resultado positivo; E) Teste em branco para a produção de quitinase; F) Teste do isolado LGMB273 para a produção de quitinase, com resultado positivo; G) Teste em branco para a produção de pectinase; H) Teste do isolado LGMB456 para a produção de pectinase, com resultado positivo; I) Teste em branco para a produção de protease; J) Teste do isolado LGMB417 para a produção de protease, com resultado positivo; K) Teste em branco para a produção de esterase; L) Teste do isolado LGMB417 para a produção de esterase, com resultado positivo; M) Teste para a produção de urease, teste em branco tubo do lado direito e isolado LGMB456 tubo do lado esquerdo, com resultado positivo.

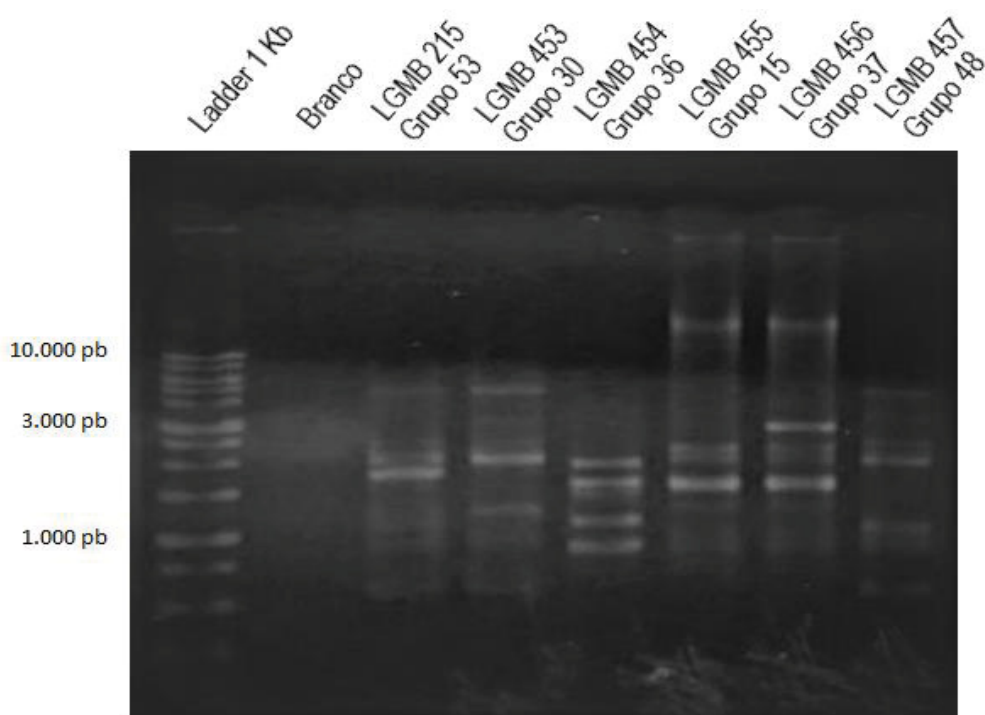
Fonte: A Autora (2019).

## APÊNDICE 2 – TABELAS COM RESULTADOS DETALHADOS

### SELEÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DE BOX-PCR

A análise dos géis aconteceu baseado no padrão de bandas já conhecido de um ladder comercial (1 Kb Plus DNA Ladder The Invitrogen™) (Quadro 1).

Figura 1 - Amplificação por BOX PCR dos isolados bacterianos.



Fonte: A Autora (2019).

Tabela 1 - Seleção dos representantes de isolados bacterianos utilizados no experimento de promoção de crescimento na cultura do milho, cultivar AG 8780.

REPRESENTANTE	QUANTIDADE DE ISOLADOS PRESENTES	BANDAS QUE AMPLIFICARAM (pb)	GENÊRO DOS ISOLADOS
LGMB12	132	Nenhuma	<i>Bacillus</i>
LGMB324	15	250	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB10	48	500	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB45	29	750 e 500	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB432	6	500 e 250	<i>Stenotrophomonas</i>
LGMB105	5	1.500 e 750	<i>Pseudomonas</i>
LGMB417	6	825 e 250	<i>Stenotrophomonas</i>
LGMB33	1	2.000 e 375	<i>Bacillus</i>

LGMB78	2	1.500, 750 e 675	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB95	2	1.000, 825 e 500	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB114	5	1.750, 1.250 e 500	<i>Bacillus</i>
LGMB125	6	1.000, 825 e 750	<i>Enterobacter</i>
LGMB346	4	1.250, 825 e 675	<i>Pseudomonas</i>
LGMB276	15	675, 500 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB459	3	2.750, 2.500 e 2.250	<i>Pseudomonas</i>
LGMB106	5	1.000, 500 e 250	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB315	1	1.750, 1.250 e 825	<i>Atlantibacter</i>
LGMB23	3	825, 750, 675 e 500	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB65	15	1.500, 825, 750 e 500	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB69	1	2.500, 1.750, 750 e 500	<i>Rhizobium</i>
LGMB90	2	2.000, 1.500, 750 e 675	<i>Bacillus</i>
LGMB99	2	1.750, 1.000, 500 e 375	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB160	1	1.750, 1.500, 825 e 750	<i>Bacillus</i>
LGMB190	6	2.500, 1.750, 1.250 e 825	<i>Bacillus</i>
LGMB318	9	1.750, 1.250, 750 e 500	<i>Bacillus</i>
LGMB 273	6	2.000, 675, 500 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB335	5	1.250, 750, 675 e 500	<i>Bacillus</i>
LGMB443	4	1.500, 1.250, 1.000 e 750	<i>Bacillus</i>
LGMB429	5	1.000, 750, 675 e 250	<i>Paenibacillus</i>
LGMB452	4	2.250, 1.500, 1.250 e 1.000	<i>Bacillus</i>
LGMB162	1	3.000, 2.750, 2.500, 1.750 e 825	<i>Bacillus</i>
LGMB240	7	1.500, 1.250, 750, 675 e 500	<i>Bacillus</i>
LGMB281	4	1.750, 1.500, 1.250, 750 e 375	<i>Bacillus</i>
LGMB420	5	1.000, 750, 675, 500 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB424	2	2.000, 1.750, 1.250, 675 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB454	1	2.500, 2.250, 1.750, 1.500 e 1.250	<i>Bacillus</i>
LGMB 456	1	3.500, 3.000, 2.750, 2.500 e 2.250	<i>Pseudomonas</i>
LGMB439	4	1.250, 1.000, 825, 750 e 675	<i>Bacillus</i>
LGMB446	1	1.750, 1.250, 1.000, 500 e 375	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB165	6	3.000, 2.750, 2.500, 1.750, 825 e 675	<i>Bacillus</i>
LGMB164	2	3.000, 2.750, 2.500, 1.750, 1.500, 825 e 750	<i>Bacillus</i>
LGMB312	1	3.000, 1.250, 825, 675, 500 e 250	<i>Bacillus</i>



LGMB426	9	1.250, 1.000, 825, 750, 675 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB444	1	2.000, 1.250, 1.000, 825, 675 e 500	<i>Bacillus</i>
LGMB20	1	2.500, 2.250, 1.500, 1.250, 825 e 375	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB127	3	2.750, 2.500, 1.750, 1.500, 1.000, 825 e 750	<i>Bacillus</i>
LGMB445	3	3.000, 2.000, 1.750, 1.250, 1.000, 675 e 375	<i>Lysinibacillus</i>
LGMB457	1	5.000, 3.500, 3.000, 2.750, 1.500, 1.250 e 825	<i>Bacillus</i>
LGMB126	1	2.500, 2.250, 2.000, 1.750, 1.500, 1.000, 825, 750 e 675	<i>Bacillus</i>
LGMB319	2	1.000 e 825	<i>Bacillus</i>
LGMB201	1	1.500, 375 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB188	1	1.000, 500, 375 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB215	2	1.750, 1.500, 825 e 500	<i>Bacillus</i>
LGMB198	1	1.500, 675, 500, 375 e 250	<i>Bacillus</i>
LGMB206	1	1.500, 825, 500, 375 e 250	<i>Enterobacter</i>
LGMB218	2	1.500, 1.000, 825, 750 e 500	<i>Bacillus</i>
LGMB199	1	1.000, 750, 675, 500, 375 e 250	<i>Bacillus</i>

Fonte: A Autora (2019).

## ESTATÍSTICA DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

Tabela 2 – Análise estatística do delineamento experimental das plantas de milho, crescidas em câmara climática de plantas e medidas com o aparelho WinRhizo. ANOVA, Teste Tukey, a 5% de significância.

Tratamento	Planta			Raiz		
	Peso Úmido (g)	Peso Seco (g)	Comprimento Total (cm)	Volume Total das Raízes (cm³)	Diâmetro Médio (mm)	Comprimento de raízes de 0 a 0,5 mm de diâmetro
LGMB12	16,67 a	2,33 ab	1645,94 a	2,12 a	0,43 a	1283,89 a
LGMB324	16,00 a	5,00 a	836,52 ab	1,73 a	0,51 a	559,02 ab
LGMB10	14,33 a	2,00 ab	734,12 ab	1,93 a	0,58 a	450,01 b
LGMB45	16,00 a	3,33 ab	788,25 ab	1,98 a	0,56 a	483,51 ab
LGMB432	13,33 a	1,67 b	684,60 ab	1,53 a	0,55 a	426,55 b
LGMB105	10,67 a	1,00 b	485,09 b	1,32 a	0,60 a	277,70 b
LGMB417	15,67 a	2,33 ab	934,04 ab	2,18 a	0,55 a	585,80 ab
LGMB33	9,67 a	3,00 ab	303,08 b	0,75 a	0,57 a	168,14 b
LGMB78	11,00 a	3,00 ab	541,70 b	1,34 a	0,56 a	310,03 b

LGMB95	10,67 a	2,67 ab	559,89 b	1,28 a	0,53 a	337,45 b
LGMB114	13,00 a	2,00 ab	688,08 ab	1,64 a	0,55 a	421,90 b
LGMB125	12,67 a	2,33 ab	578,59 ab	1,33 a	0,52 a	375,14 b
LGMB346	12,33 a	2,00 ab	552,53 b	1,28 a	0,53 a	354,81 b
LGMB276	11,00 a	2,67 ab	709,23 ab	1,47 a	0,51 a	442,92 b
LGMB459	8,67 a	1,33 b	382,14 b	0,73 a	0,51 a	249,10 b
LGMB106	13,00 a	3,67 ab	748,91 ab	1,86 a	0,57 a	461,25 b
LGMB315	9,00 a	2,33 ab	761,54 ab	1,12 a	0,45 a	558,03 ab
LGMB23	15,33 a	3,67 ab	799,53 ab	1,97 a	0,56 a	487,33 ab
LGMB65	13,33 a	1,67 b	777,88 ab	1,84 a	0,55 a	481,10 ab
LGMB69	13,00 a	1,67 b	741,96 ab	1,78 a	0,56 a	458,13 b
LGMB90	8,67 a	1,67 b	401,05 b	0,84 a	0,51 a	264,94 b
LGMB99	11,33 a	1,67 b	564,63 b	1,43 a	0,57 a	334,18 b
LGMB160	11,33 a	1,67 b	521,06 b	1,28 a	0,57 a	304,91 b
LGMB190	9,00 a	2,33 ab	412,48 b	1,06 a	0,58 a	247,20 b
LGMB318	9,33 a	3,00 ab	537,80 b	1,00 a	0,49 a	365,00 b
LGMB273	11,00 a	3,33 ab	760,06 ab	1,49 a	0,50 a	512,71 ab
LGMB335	9,33 a	3,00 ab	425,71 b	0,95 a	0,52 a	241,24 b
LGMB443	13,00 a	2,33 ab	660,52 ab	1,64 a	0,56 a	406,73 b
LGMB429	16,67 a	2,33 ab	764,67 ab	2,34 a	0,61 a	439,50 b
LGMB452	10,00 a	1,67 b	460,40 b	1,29 a	0,60 a	269,71 b
LGMB162	8,33 a	1,33 b	429,52 b	0,89 a	0,51 a	285,96 b
LGMB240	8,33 a	1,00 b	512,00 b	1,22 a	0,55 a	317,30 b
LGMB281	12,33 a	1,33 b	548,64 b	1,30 a	0,59 a	335,68 b
LGMB420	14,67 a	1,33 b	570,62 b	1,39 a	0,56 a	339,90 b
LGMB424	12,67 a	1,00 b	644,74 ab	1,45 a	0,55 a	408,14 b
LGMB454	8,67 a	1,00 b	562,39 b	1,24 a	0,53 a	355,28 b
LGMB456	11,33 a	1,00 b	832,51 ab	1,58 a	0,49 a	559,14 ab
LGMB439	9,67 a	1,00 b	624,06 ab	1,21 a	0,51 a	434,39 b
LGMB446	13,33 a	1,00 b	713,54 ab	1,47 a	0,51 a	461,02 b
LGMB165	7,67 a	1,00 b	229,82 b	0,64 a	0,57 a	131,01 b
LGMB164	12,67 a	1,00 b	742,55 ab	1,34 a	0,49 a	500,40 ab
LGMB312	12,00 a	1,00 b	508,37 b	1,03 a	0,50 a	320,67 b
LGMB426	13,33 a	1,00 b	809,61 ab	1,68 a	0,53 a	543,81 ab
LGMB444	13,67 a	2,00 ab	753,50 ab	1,60 a	0,53 a	481,94 ab
LGMB20	11,33 a	1,33 b	567,62 b	1,25 a	0,53 a	355,40 b
LGMB127	13,00 a	1,33 b	590,36 ab	1,34 a	0,54 a	378,77 b
LGMB445	9,00 a	1,00 b	539,83 b	1,08 a	0,52 a	343,64 b
LGMB457	10,67 a	1,00 b	607,95 ab	1,48 a	0,56 a	381,74 b
LGMB126	8,33 a	1,00 b	505,65 b	0,95 a	0,49 a	328,69 b
LGMB319	14,33 a	1,33 b	1079,52 ab	2,15 a	0,50 a	724,25 ab
LGMB201	10,67 a	1,33 b	763,81 ab	1,48 a	0,50 a	509,15 ab
LGMB188	9,67 a	1,00 b	481,61 b	1,02 a	0,52 a	297,69 b
LGMB215	9,67 a	1,00 b	493,12 b	1,02 a	0,51 a	319,52 b
LGMB198	11,67 a	1,00 b	795,98 ab	1,48 a	0,49 a	526,16 ab
LGMB206	8,67 a	1,00 b	458,65 b	0,97 a	0,51 a	277,21 b

LGMB218	11,33 a	1,33 b	532,99 b	1,44 a	0,59 a	309,57 b
LGMB199	11,33 a	1,33 b	523,55 b	1,28 a	0,57 a	318,28 b
AzoTotal	10,33 a	1,33 b	651,36 ab	1,26 a	0,50 a	402,98 b
Testemunha	13,33 a	1,33 b	731,39 ab	1,47 a	0,51 a	486,56 ab
Valor p	0,17	0,00	0,11	0,14	0,25	0,07
CV %	31,18	49,87	49,06	41,70	11,27	58,23
DMS	12,41	3,07	1067,69	1,99	0,21	809,34

Fonte: A Autora (2019).

## REFERÊNCIAS APÊNDICES

- ARAÚJO, L. M.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**. v.155, n.6, p. 491-495, 2004.
- BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L.; ZOCK, A.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3328-3338, 2002.
- CATELLAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. EMBRAPA Soja, Londrina, 1999, 36p.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia Acta **Scientiarum Agronomy**, v.32, n.2, p.359-366, 2010.
- DYE, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia* 1 The “amylovora” group. **New Zeal Journal Science**, v.11, p.590-607, 1968.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597-607, 1975.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**. Circular n.347, 1938.
- IKEDA, A. M. **Bioprospecção e identificação de bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.) para promoção de crescimento vegetal e controle biológico**. f. 94. Tese (Doutorado em Genética). Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2014.
- KING, E. O.; WARD, M.; RANEY D. E. J. **J. Lab. Clin. Méd.** v. 44, 1954. 301p.
- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1459-1465, 2007.
- MOURA, J. M., FERREIRA, A. F. C., SILVA, F. M. M., RIZZI, J., PINTO, L. A. A. Obtenção de quitina a partir de carapaças de siri (*Maia squinado*): uso de um planejamento experimental na etapa de demineralização. **Vetor**, 717p. 2005.
- RENEWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assesment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v.40, p.524-532, 1991.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant Soil**, v.172, p.261-269, 1995.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analitycal Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SIERRA, G. A. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. **Antonine van Leeuwenhoeck**, v.28, p.15-22, 1957.